Molekulare Analyse der β-Tubulingene aus dem Makronukleus des hypotrichen Ciliaten *Stylonychia lemnae*

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

KARL KLAUS CONZELMANN

aus Tailfingen

1988

Molekulare Analyse der β-Tubulingene aus dem Makronukleus des hypotrichen Ciliaten *Stylonychia lemnae*

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

KARL KLAUS CONZELMANN

aus Tailfingen

1988

Tag der mündlichen Prüfung:	22. Dezember 1987
Dekan:	Prof. Dr. D. Varjú
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Ammermann
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. V. Hemleben

Diese Arbeit wurde am Institut für Biologie III, Abt. Zellbiologie,
der Universität Tübingen angefertigt.

Herrn Prof. Dr. D. Ammermann danke ich für die Überlassung des Themas
und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Prof. W. Seyffert (Lehrbereich Genetik) stellte freundlicherweise
seinen Computer und die Software für DNA Analysen zur Verfügung.

Allen Mitarbeitern der Abteilung danke ich für die gute Zusammenarbeit

Besonderer Dank gebührt Frau Dr. Elke Helftenbein,
deren stetige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft
wesentlich zum guten Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Die Arbeit wurde durch ein Stipendium nach dem Landesgraduierten-
förderungsgesetz finanziert.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Conzelmann K K und Helftenbein E (1987):

Nucleotide sequence and expression of two β-tubulingenes in *Stylonychia lemnae*. J Mol Biol, 198

I N H A L T

	ABKÜRZUNGEN	
	BEZUGSQUELLEN	
1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	5
2.1	Untersuchungsobjekt und Kulturbedingungen	5
2.2	DNA-Isolierung aus *Stylonychia lemnae*	5
2.2.1	Makronukleus-DNA	5
2.2.2	Mikronukleus-DNA	6
2.3	RNA-Isolierungen	6
2.3.1	Gesamt-RNA	6
2.3.2	Polysomale RNA	6
2.3.3	Poly $(A)^+$ RNA Präparation	7
2.4	Bakterien und Plasmide	8
2.4.1	Verwendete Plasmide und Bakterienstämme	8
2.4.2	Anzucht der Bakterien	8
2.4.3	Dauerkulturen der Bakterienklone	8
2.4.4	Plasmidisolierungen nach Birnboim & Doly (1979)	8
2.4.4.1	Große Plasmidpräparation	8
2.4.4.2	Kleine Plasmidpräparation	9
2.4.5	Transformation der Bakterien mit Plasmiden	10
2.5	Elektrophorese	10
2.5.1	Nichtdenaturierende Gele	10
2.5.1.1	Agarosegele	10
2.5.1.2	Polyacrylamidgele	11
2.5.2	Denaturierende Gele	11
2.5.2.1	Glyoxalgele für RNA	11
2.5.2.2	Polyacrylamid/Harnstoffgele für Sequenzierproben und RNA	11
2.5.3	Anfärben der Gele	12
2.5.4	Elution von DNA aus Agarosegelen	12
2.6	Transfer von DNA und RNA auf Filter	13
2.6.1	DNA Dot Blot	13
2.6.2	Southern - Transfer	13
2.6.3	Northern - Transfer	13
2.6.4	Kolonietransfer	13
2.7	Hybridisierungen	14
2.7.1	Gelhybridisierungen	14
2.7.1.1	Vorbereitung der Gele	14
2.7.1.2	Hybridisierungsbedingungen	14

2.7.2	Filterhybridisierungen	15
2.7.3	RNA-Hybridisierungen	15
2.7.4	Autoradiographie	15
2.8	DNA-Klonierungen	15
2.8.1	Entfernung von 3'-überhängen mit Bal 31	15
2.8.2	Auffüllen der 3'-Enden mit Klenow-Polymerase	16
2.8.3	Vorbereitung der Linker	16
2.8.4	Vektorpräparierung	16
2.8.5	Ligationen	17
2.8.5.1	Linker-Insert Ligation	17
2.8.5.2	Vektor-Insert Ligation	17
2.9	Anwendung von Nukleasen	17
2.9.1	DNase I	17
2.9.2	Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen	17
2.9.3	RNase	18
2.9.4	Spezifische RNasen	18
2.10	Radioaktive Markierungen von DNA und RNA	18
2.10.1	DNA - Markierungen	18
2.10.1.1	Nicktranslation der DNA	18
2.10.1.2	5'-Endmarkierung (Kinase)	19
2.10.1.3	3'-Endmarkierung (TdT)	19
2.10.1.4	3'-Markierung (Klenowfragment)	19
2.10.1.5	Markierung bei der enzymatischen Sequenzierung	19
2.10.2	RNA - Markierungen	20
2.10.2.1	5'-Endmarkierung (Kinase)	20
2.10.2.2	3'-Endmarkierung (RNA Ligase)	20
2.11	DNA-Sequenzierungen	20
2.11.1	Sequenzierung nach Maxam und Gilbert (1977)	20
2.11.1.1	Probenvorbereitung	20
2.11.1.2	Basenspezifische Reaktionen	20
2.11.1.3	Sequenzelektrophorese	22
2.11.2	Sequenzierung nach Sanger et al. (1977)	22
2.12	c-DNA - Synthese	23
2.12.1	Synthese des ersten Stranges	23
2.12.2	Synthese des zweiten Stranges	23
2.12.4	Klonierung der c-DNA	23
3	ERGEBNISSE	24
3.1	Klonierung der Makronukleus-Gene	24
3.1.1	Lokalisierung der β-Tubulingene in der Makronukleus-DNA	24
3.1.2	Anreicherung und Klonierung der β-Tubulingene	24
3.1.3	Identifizierung der positiven Klone	26
3.2	Restriktionsanalyse der β-Tubulingene	28

3.3	Sequenzierung und Sequenzanalyse	29
3.3.1	Der codierende Bereich der ß-Tubulingene	32
3.3.1.1	Nukleotidsequenz und Codongebrauch	32
3.3.1.2	Die vorhergesagte Aminosäuresequenz und Vergleich mit anderen Organismen	36
3.3.2	Die nichtcodierenden Bereiche der ß-Tubulingene	40
3.3.2.1	Die Struktur der nichtkodierenden Regionen	40
3.3.2.2	Transkription der ß-Tubulingene	45
3.3.2.3	Regulative Sequenzen in den nichtcodierenden Bereichen	45
3.4	Kopienzahl der ß-Tubulingene im Makronukleus	49
3.5	RNA-Analysen	52
3.5.1	Gesamt-RNA von Stylonychia lemnae	52
3.5.2	Polysomale RNA	53
3.5.3	Poly (A)$^+$ RNA	54
3.5.4	RNA-Hybridisierungen	54
3.5.5	RNase-Analysen der Gesamt-RNA	56
3.5.6	cDNA-Synthese	58
4	DISKUSSION	60
5	ZUSAMMENFASSUNG	72
6	SUMMARY	74
7	LITERATUR	76
	LEBENSLAUF	
	AKADEMISCHE LEHRER	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0124

ABKÜRZUNGEN:

A	Ampère
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulphat
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
b(p)	Basen (-paare)
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin
C	Celsius
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cpm	counts per minute (gemessene Zerfälle pro Minute)
D	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosin 5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin 5'-Triphosphat
ddATP	2',3'-Didesoxyadenosin 5'-Triphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosid 5'-Triphosphat
DEP	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxyguanosin 5'-Triphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMS	Dimethylsulphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid 5'-Triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin 5'-Triphosphat
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	1,2 Bis-(2-aminoaethoxyaethan) N,N,N',N'-tetra-essigsäure
g	Erdbeschleunigung
HEPES	N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure
IPTG	Isopropyl ß-D-Thiogalactopyranosid
kb	1000 Basen (-paare)
mRNA	messenger RNA

NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (ox)
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
OD	Optische Dichte
PEG	Polyethylenglycoll
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulphat
SSC	Standard Saline Citrate (0,15 M NaCl; 0,015 M Na-citrat)
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris(-hydroxymethyl-)aminomethan
U	unit(s), Einheit der Enzymaktivität
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vol	Volumen/Volumina
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid

BEZUGSQUELLEN:

Alle DNA- und RNA modifizierenden Enzyme stammen, wenn im Text nicht anders angegeben, von Pharmacia. Die meisten Chemikalien wurden von der Firma Merck im höchsten verfügbaren Reinheitsgrad bezogen, andere Lieferanten sind im Text erwähnt. Radiochemikalien wurden von Amersham-Buchler bezogen.

1. EINLEITUNG

Die hypotrichen Ciliaten besitzen - wie alle anderen Ciliaten auch - zwei verschiedene Arten von Zellkernen: kleine 'generative' Mikronuklei und große, DNA-reiche Makronuklei, die den Phänotyp des Individuums bestimmen und als 'somatisch' oder 'vegetativ' bezeichnet werden (Grell, 1973; Raikov, 1982). Der Mikronukleus scheint, wenigstens bei manchen Arten, im vegetativen Zellzyklus entbehrlich zu sein; er zeigt keine meßbare Transkriptionsaktivität und kann experimentell entfernt werden, ohne die Lebensfähigkeit der Klone wesentlich zu beeinträchtigen. Die vegetative Phase ist allerdings auf eine begrenzte und je nach Art unterschiedliche Anzahl von Zellzyklen beschränkt; ohne sexuelle Reproduktion sterben die Klone der meisten Arten aus (Ammermann, 1971). Diese sexuelle Reproduktion findet in der für die Ciliaten charakteristischen Form der Konjugation zwischen zwei Zellen, die verschiedenen Paarungstypen angehören, statt. Im Verlauf der Konjugation durchlaufen die Mikronuklei meiotische Teilungen, von den entstehenden Kernen bleibt einer erhalten. Dieser teilt sich postmeiotisch und bringt zwei Gametenkerne, einen stationären und einen Wanderkern, hervor. Die Wanderkerne der beiden konjugierenden Zellen werden über die Plasmabrücke, die sich im Bereich der Mundfelder gebildet hat, ausgetauscht und verschmelzen mit dem Stationärkern der Rezipientenzelle. Die Synkarya teilen sich nach der Trennung der Zellen ('Exkonjuganten') und einer der beiden Tochterkerne entwickelt sich zum neuen Makronukleus, während der alte Makronukleus degeneriert und resorbiert wird; der andere Tochterkern wird zum neuen Mikronukleus. Diese Vorgänge laufen bei den verschiedenen Arten der Hypotrichida sehr ähnlich ab, Unterschiede liegen im Detail (Ammermann, 1965; Ammermann et al., 1974; Heckmann, 1963; 1964).

Im Verlauf der Makronukleusentwicklung findet eine drastische Umorganisation des genetischen Materials statt. Kurz nach der Trennung der Exkonjuganten werden in der neuen Makronukleusanlage Chromosomen sichtbar. Bei *S. lemnae* verkümmern 80% dieser Chromosomen und werden ins Cytoplasma ausgeschleust, während sich die restlichen Chromosomen durch Polytänisierung zu Riesenchromosomen entwickeln. Der Großteil der Riesenchromosomen-DNA wird degradiert und nur etwa 2% der ursprünglichen Mikronukleus-DNA bleibt in

UNIV. LINDAU LBZ.

diesem DNA-armen Stadium erhalten. Nach mehreren Replikationsrunden hat der nun reife Makronukleus seinen endgültigen hohen DNA-Gehalt erlangt. Die Komplexität des Makronukleus von *Stylonychia* ist um den Faktor 100 geringer als die des Mikronukleus und liegt mit etwa $1{,}5 \times 10^{10}$ D lediglich um den Faktor 10 über der von *E. coli* (Ammermann et al., 1974; Lauth et al., 1976; Steinbrück et al., 1981).

Der frappierendste Unterschied zwischen Makronukleus und Mikronukleus (und anderen eukaryontischen Zellkernen) besteht jedoch in der Größe und der Organisation der DNA-Moleküle. Die DNA des Makronukleus liegt bei den hypotrichen Ciliaten nicht in Form von langen Chromosomen vor, sondern in kurzen Molekülen, die wenige hundert bis etwa 20000 bp lang sind (Elsevier et al., 1978; Lipps und Steinbrück, 1978; Prescott et al., 1971; 1973). Diese 'gene-sized pieces' besitzen an den Enden kurze 'inverted repeats' der Sequenz 5'-$C_4A_4C_4A_4C_4$ und einzelsträngige Überhänge an den 3'-Enden mit der Sequenz $G_4T_4G_4T_4$-3' (bei Euplotes $G_2T_4G_4T_4$-3') (Helftenbein, 1985; Klobutcher et al., 1981; Oka et al., 1980; Pluta et al., 1982). Die charakteristischen Endstrukturen erfüllen höchstwahrscheinlich Telomerfunktion und sind für die Integrität der Molekule unerläßlich (Blackburn et al., 1983; Blackburn, 1984; Wünning und Lipps, 1983).

Sequenzanalysen einzelner Makronukleusmoleküle (Helftenbein, 1986; Kaine und Spear, 1982), Hybridisierungen mit spezifischen Genproben (rDNAs, Histone, Aktin) (Elsevier et al., 1978; Lipps und Steinbrück, 1978; Spear, 1980) sowie Transformationsexperimente mit rekombinanten Makronukleus-Molekulen (Meyers und Helftenbein, im Druck) stützten die Vermutung, daß jedes Makronukleus-Molekul ein Gen (oder wenige Gene wie bei den Histonen) enthält und als eine Replikations- und Transkriptionseinheit vorliegt, die alle Sequenzen oder Strukturen, die an regulierten Replikations-, Transkriptions- und auch Translationsvorgangen beteiligt sind, auf engstem Raum direkt neben dem zu steuernden Gen enthält, und von den meisten 'irrelevanten' DNA-Sequenzen durch das 'DNA-Processing' während der Makronukleusentwicklung befreit ist.

Obwohl der Makronukleus so eine einzigartige Möglichkeit bietet, die Genexpression bei Eukaryonten zu untersuchen, lag bis zum Beginn dieser Arbeit lediglich die komplette Sequenz von zwei charakterisierten Polymerase

II Genen hypotricher Ciliaten vor (ein Aktingen von *Oxytricha fallax*, Kaine & Spear, 1982 und ein α-Tubulin von *S. lemnae*, Helftenbein, 1985). Diese zeigten jedoch keine übereinstimmenden Sequenzen in den nichtcodierenden Regionen.

Durch die Sequenzanalyse von weiteren Makronukleus-Molekülen einer Species sollten Replikationsorigins, Promotoren, Transkriptionsterminations- oder RNA-Processing-Signale leicht identifiziert werden können. Vorteilhafterweise sollten solche Gene miteinander verglichen werden, die koordiniert reguliert und exprimiert werden. Als ideal für diesen Zweck erschienen die in anderen Organismen gut untersuchten Tubulingene.

Alle eukaryontischen Zellen, mit Ausnahme kernloser Erythrocyten, besitzen Mikrotubuli. Dies sind röhrenförmige Strukturelemente, die eine Vielzahl von Aufgaben innerhalb der Zelle erfüllen. Sie sind Hauptbestandteile des Cytoskeletts, der Mitose- und Meiosespindeln, der eukaryontischen Cilien und Flagellen und neuronaler Fortsätze und wirken so an elementaren Vorgängen in der Zelle mit: Aufrechterhaltung der Zellform, Zellteilung, Zellbewegung und intrazellulärer Transport (Kirschner, 1978). Der Hauptbestandteil der Mikrotubuli ist Tubulin, ein Heterodimer aus zwei verwandten Polypeptiden, α- und β-Tubulin (Bryan und Wilson, 1971) mit einem Molekulargewicht von je 50.000. Die Tubuline sind stark konservierte Proteine und werden in eukaryontischen Zellen durch eine unterschiedliche Anzahl von Genen codiert (Cleveland et al., 1980).

In Säugern existieren Multigenfamilien, die 10-20 Kopien Tubulin-homologer Sequenzen enthalten, deren Großteil jedoch Pseudogene darstellt. (Reviews: Cowan, 1984; Cleveland und Sullivan, 1985). Beim Menschen werden von bis jetzt zwölf charakterisierten β-Tubulingenen vier exprimiert, während man drei funktionelle α-Tubulingene kennt (Cowan, 1984; Dobner et al., 1987; Hall und Cowan, 1985; Lewis et al., 1985a). Von der Maus sind sechs funktionelle α- und sechs β-Tubulingene bekannt (Lewis et al., 1985b; Villasante et al., 1986; Wang et al., 1986) und zwei α- und drei β-Tubulingene in der Ratte (Bond und Farmer, 1983; Bond et al., 1984; Ginzburg et al., 1981; Lemischka und Sharp, 1982). Im Gegensatz zu den oben beschriebenen großen Multigenfamilien der Säugetiere besitzt das Hühnchen eine geringere Anzahl von Sequenzen, die Homologien zum Tubulin zeigen. Mindestens fünf von sieben bis

neun vorhandenen β-Tubulingenen werden exprimiert (Lopata et al., 1983; Sullivan et al., 1986). *Drosophila* besitzt vier α- und vier β-Tubulingene, die alle exprimiert werden (Raff, 1984)

Die Genome niederer Eukaryonten enthalten gegenüber den beschriebenen höheren Eukaryonten meist nur eine geringe Zahl von Tubulingenen. *Physarum* besitzt vier α- und vier β-Tubulingene von denen zwei α- und alle drei β-Tubulingene exprimiert werden (Burland et al., 1983; 1984; Schedl et al., 1984). Beide α- und beide β-Tubulingene von *Chlamydomonas* sind funktionell (Brunke et al., 1982; Monteiro und Cox, 1987), doch codieren die beiden β-Tubulingene ein identisches Polypeptid (Youngblom et al., 1984). Ein einziges β-Tubulingen besitzt die Hefe (Neff et al., 1983) und auch in *Tetrahymena* wurde bislang ebenfalls nur ein β-Tubulingen gefunden (Guttman und Gorovsky, 1979).

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Organisation der β-Tubulingene im Makronukleus von *S. lemnae* und deren molekulare Struktur und Funktion aufzuklären. Von besonderem Interesse sind dabei - neben dem Vergleich der codierten Aminosäuresequenz mit den β-Tubulinen anderer Organismen - eventuell vorhandene regulative Sequenzen in den nichtcodierenden Bereichen der Makronukleusmoleküle, die im Vergleich der β-Tubulingene untereinander und im Vergleich mit den inzwischen sequenzierten α-Tubulingenen von *S. lemnae* (Helftenbein, 1985; Helftenbein und Müller, in Vorbereitung) identifiziert werden könnten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchungsobjekt und Kulturbedingungen

Die Versuche wurden an dem hypotrichen Ciliaten *Stylonychia lemnae* (Ammermann & Schlegel, 1983; Steinbrück & Schlegel, 1983) durchgeführt. Die Zellen wachsen in Petrischalen bei 20 - 24°C in Pringsheim-Lösung und werden täglich mit einer *Chlorogonium elongatum* - Suspension gefuttert (Ammermann et al., 1974).

Pringsheim-Lösung:	0,11 mM Na_2HPO_4
	0,08 mM $MgSO_4$
	0,85 mM $Ca(NO_3)_2$
	0,35 mM KCl
	pH 6,9

2.2 DNA-Isolierung aus *Stylonychia lemnae*

2.2.1 Makronukleus-DNA

Die Zellen wurden, nachdem sie einen Tag lang gehungert hatten, durch Filtration über eine 120 µm Nylongaze von groben Verunreinigungen befreit, auf einer 20 bis 40 µm Gaze gesammelt und sofort in zweifach konzentriertem Lysiermedium A 3 Minuten bei 0°C lysiert (Ammermann et al., 1974). Das Filtrat wurde über eine 10 µm Nickelgaze gegeben, um die Mikronuklei und Zellfragmente abzutrennen. Die Makronuklei wurden von der Gaze gespült und durch 1,4 M Saccharose in Lysiermedium A zentrifugiert (20 min bei 2000 rpm und 4°C; Labofuge II, Heraeus Christ). Die pelletierten Kerne wurden in 5 ml Lysiermedium A suspendiert und nochmals zentrifugiert. Das Pellet wurde in 65°C warmem Kavenoff-Zimm-Puffer (Kavenoff & Zimm, 1973) aufgenommen und 15 Minuten bei dieser Temperatur inkubiert. Nach Abkühlung auf 50°C wurde $^1/_{10}$ Volumen Proteinase K - Lösung zugegeben (10 mg/ml in TE) und 4 bis 12 Stunden bei 50°C inkubiert. Danach wurde die DNA zweimal mit Phenol/Chloroform (1/1) extrahiert, über Nacht gegen TE dialysiert und in Ethanol gefällt.

Lysiermedium A:	0,05% Triton-X-100
	0,1 mg/ml Spermidinphosphat

Kavenoff-Zimm-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 9,5
0,5 M EDTA
1% SDS

2.2.2 Mikronukleus-DNA

Die durch die 10 µm Gaze gefilterten Mikronuklei (2.2.1) wurden bei 4°C mit 800 rpm 10 Minuten pelletiert, in Lysiermedium A aufgenommen und mikroskopisch auf ihre Reinheit überprüft. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie in 2.2.1 beschrieben, doch wurde die DNA zum Schluß nicht gefällt, sondern eingeengt und in TE bei 4°C aufbewahrt.

2.3 RNA - Isolierungen

2.3.1 Gesamt-RNA

Zellen aus ca. 50 Kulturschalen wurden auf einer 30 µm Gaze gesammelt, mit 10 mM Tris-HCl pH 7,6 in kalibrierte Zentrifugengläser (Erdölprüfer 3113, Heraeus Christ) gespült und bei 40 g 3 Minuten konzentriert. Zwei ml der Zellen wurden in einen Dounce-Homogenisator überführt, in 10 ml Homogenisationspuffer durch wenige Potterbewegungen vorsichtig lysiert und 10 Minuten auf Eis stehen gelassen. Das Lysat wurde mit 1 gr/ml CsCl versetzt und auf 3 ml 5,7 M CsCl in 0,1 M EDTA pH 7,5 in TI 50 Polyallomerröhrchen (Beckmann) geschichtet. Die RNA wurde bei 40 000 rpm (20 Stunden, 25°C) pelletiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, in 200 - 400 µl H_2O oder TE gelöst und in Ethanol gefällt (Glisin et al., 1974). Vor der weiteren Verwendung wurde kontaminierende DNA durch DNase I entfernt (2.9.1).

3 * Homogenisationspuffer: 100 mM Tris-HCl pH 7,4
4% SDS
50 mM $MgCl_2$
50 µg/ml Heparin

2.3.2 Polysomale RNA

Polysomale RNA wurde nach Palacios et al. (1972) und Buell et al. (1977) (kombiniert) isoliert. Die Zellen wurden wie oben beschrieben konzentriert (2.3.1). Nach Zugabe von 1 Volumen H_2O und 1 Volumen 3 * Homogenisationspuffer wurde vorsichtig im Dounce-Homogenisator lysiert. Zellkerne und Zell-

fragmente wurden 5 Minuten bei 3000 rpm und 4°C pelletiert (Minifuge II, Heraeus Christ). Der Überstand wurde dekantiert, auf 0,5% Triton-X-100 eingestellt und vorsichtig 3 bis 5 Minuten gerührt, um die Polysomen vom Endoplasmatischen Retikulum zu lösen. Weitere Zellfragmente wurden durch 15 minütige Zentrifugation (10.000 rpm, 4°C, Vetter, AS 4.13-Rotor) pelletiert. Der Überstand wurde auf einen diskontinuierlichen Sucrosegradienten gegeben (2 ml 2,5 M Sucrose und 4 ml 1 M Sucrose in 30 mM Tris-HCl pH 7,6; 30 mM KCl; 10 mM $MgCl_2$ und 50 µg/ml Heparin) und im SW 41 (Beckmann) 2 Stunden bei 40 000 rpm und 5°C zentrifugiert. Die Polysomen im Interphasebereich wurden mit einer Spritze abgezogen und 2 Stunden gegen 10 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,5 mM $MgCl_2$; 1 mM K^+-EDTA bei 4°C dialysiert. Das Dialysat wurde auf 20 mM $MgCl_2$ eingestellt und die Ribosomenuntereinheiten 2 Stunden mit 53.000 rpm bei 5°C im SW 65 pelletiert. Der RNA-haltige Überstand wurde zweimal phenolisiert und die RNA in Ethanol ausgefällt.

3 * Homogenisationspuffer:
- 30 mM Tris-HCl pH 7,6
- 30 mM KCl
- 10 mM $MgCl_2$
- 0,2 M Sucrose
- 0,15% Triton-X-100
- 0,1 % Heparin
- 0,05% β-Mercaptoethanol

2.3.3 Poly $(A)^+$ RNA Präparation

Die Anreicherung der Poly $(A)^+$ RNA erfolgte durch Affinitätschromatographie an Oligo (dT) Cellulose (Aviv & Leder, 1972). Die Säule (1 ml Volumen) wurde mit 5 Volumina 0,1 M KOH gewaschen und mit 10 Volumina Auftrag-Puffer (0,5 M KCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5) wieder neutralisiert. Die Gesamt-RNA (2.3.1) wurde nach kurzem Erwärmen (5 min, 65°C) in Auftrag-Puffer auf die Säule gegeben und mit 2 Volumina Auftrag-Puffer nachgespült. Durch Waschen mit 2 Volumina Elutionspuffer 1 (0,1 M KCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5) wurde die nicht gebundene RNA entfernt und die Poly $(A)^+$ RNA anschließend bei 37°C in 2 Volumina 10 mM Tris-HCl pH 7,5 eluiert. Durch einen weiteren Säulenlauf wurde die RNA nochmals gereinigt.

2.4 Bakterien und Plasmide

2.4.1 Verwendete Plasmide und Bakterienstämme

Die Makronukleus-DNA wurde im Plasmid pUC 12 kloniert, als Wirtsbakterium wurde E. coli JM 83 benutzt (Vieira & Messing, 1982). Fragmente der klonierten Makronukleus-DNA wurden für die Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) im Plasmid pGEM-3™ (Promega Biotech) subkloniert. Wirtsbakterien für dieses Plasmid waren E. coli HB 101 und E. coli SK 375 (Boyer & Roulland-Dussoix, 1969)

Die heterologe Probe, mit der die transformierten Bakterien gescreent wurden, war pβH (Cleveland et al., 1980), das ein β-Tubulin-c-DNA-Fragment aus dem Hühnchen enthält.

2.4.2 Anzucht der Bakterien

Sämtliche Bakterienstämme wurden bei 37°C unter Schütteln in LB angezogen (0.5% Hefeextrakt; 1% Bactotrypton; 0,5% NaCl; 1 mM $MgCl_2$;0, 1% Glucose). Agarplatten enthielten 15 g Agar pro Liter LB. Zur Selektion plasmidhaltiger Bakterien wurden 100 mg Ampicillin/l zugesetzt. JM 83 Zellen, die rekombinante Plasmide enthielten, konnten durch Zugabe von 2 ml X-Gal (2% in DMF) zu einem Liter Agar-Medium identifiziert werden (weiße Kolonien durch Insertionsinaktivierung des lac Z Gens, ohne Insert blau; Vieira und Messing, 1980).

2.4.3 Dauerkulturen der Bakterienklone

2 ml einer Bakterienkultur wurden 5 Minuten bei 3000 rpm in der Minifuge 2 (Heraeus Christ) zentrifugiert, das Zellpellet in 1 ml LB-Medium mit 50% Glycerin aufgenommen und bei -70°C eingefroren.

2.4.4 Plasmidisolierungen

2.4.4.1 Große Plasmidpräparation nach Birnboim und Doly (1979)

Die Zellen einer 1-Liter übernachtkultur (mit 5 ml einer exponentiell wachsenden Startkultur angeimpft) wurden bei 5000 rpm und 4°C in der Hermle Zentrifuge in 250 ml-Bechern pelletiert (Vetter A 6.14 Rotor). Die Bakterien wurden in 15 ml Lysepuffer ohne Lysozym suspendiert, mit 10 ml Lysepuffer, der Lysozym enthielt, versetzt und 30 Minuten im Eisbad inkubiert. Danach wurden 50 ml alkalische SDS-Lösung zugegeben, nach 5 Minuten auf Eis mit 37,5 ml 3 M Natriumacetat pH 4,8 neutralisiert und weitere 60 Minuten im Eis

inkubiert. Die Zelltrümmer, chromosomale DNA und Proteine wurden bei 10.000 rpm und 4°C 60 Minuten pelletiert. Die Plasmide aus dem Überstand wurden mit 2 Volumina Ethanol (auf -70°C vorgekühlt) 2 Stunden lang bei -20°C ausgefällt, pelletiert (60 Minuten, 10000 rpm, 4°C) und in 25 ml TE gelöst. Nach einer weiteren Ethanolfällung wurden die Plasmide in 15,8 ml TE gelöst, die Lösung mit 17 gr CsCl und 700 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml in TE) versetzt und gegebenenfalls mit TE bzw. CsCl auf den Brechungsindex 1,392 eingestellt. (Nach der Ethidiumbromidzugabe wurden die Becher in Aluminiumfolie eingewickelt, um die Proben vor Lichteinwirkung zu schützen). Die Lösung wurde anschließend im VTI 50 Rotor in Polyallomer Quick-Seal Röhrchen 20 Stunden bei 40 000 rpm und 20°C zentrifugiert (Beckmann-Zentrifuge L 5.65) (Radloff et al., 1967). Die im UV deutlich sichtbaren Banden der supercoil- und offenzirkulären Plasmide wurden mit einer Spritze durch seitliches Anstechen der Röhrchen abgezogen und getrennt weiterverarbeitet. Das Ethidiumbromid wurde duch mehrfache Extraktion mit Isoamylalkohol entfernt, die DNA-Lösung durch Zugabe von H_2O verdünnt und mit Ethanol bei -20°C gefällt. Das mitgefallene CsCl wurde durch weitere Ethanolfällungen und Waschungen mit 70% Ethanol entfernt. Eventuelle Kontaminationen mit RNA wurden durch RNase-Behandlung beseitigt.

Lyse-Puffer:	25 mM Tris-HCl pH 8,0
	10 mM EDTA
	50 mM Glucose
	2 mg/ml Lysozym
alkalische SDS-Lösung:	0,2 N NaOH
	1 % SDS

2.4.4.2 Kleine Plasmidpräparation nach Birnboim und Doly (1979)

1,5 ml einer 5 ml Übernachtkultur der zu testenden Bakterienklone wurden in sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäßen 4 Minuten bei 3.000 rpm in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Lysepuffer (2.4.1) suspendiert und 30 Minuten im Eisbad inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer SDS-Lösung (2.4.1) und weiteren 5 Minuten bei 0°C wurde mit 150 µl 3 M Natriumacetat pH 4,8 neutralisiert. Das Lysat wurde nochmals 60

Minuten auf Eis inkubiert und dann 20 Minuten in der Eppendorfzentrifuge (12.000 rpm, 4°C) zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die DNA mit 1 ml Ethanol ausgefällt (20 Minuten im Trockeneis). Nach 15 minütiger Zentrifugation (Eppendorf, 12 000 rpm, 4°C) wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, im "Speed-Vac-Concentrator" (Abimed) getrocknet und in 100 µl TE gelöst. Die RNA wurde durch RNase-Behandlung entfernt (15 Minuten, 37°C; 2.9.3), anschließend wurde die DNA-Lösung phenolisiert, die DNA in Ethanol gefällt und wieder in H_2O oder TE gelöst.

2.4.5 Transformation der Bakterien mit Plasmiden

40 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer Übernachtkultur des Bakterienstammes JM 83 angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zur OD_{600} = 0,3-0,4 wachsen gelassen. Dann wurden die Zellen bei 3.000 rpm und 4°C in der Minifuge II (Heraeus Christ) pelletiert und in 20 ml eiskaltem 50 mM $CaCl_2$ aufgenommen, vorsichtig suspendiert und 20 Minuten bei 0°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 2 ml der $CaCl_2$-Lösung aufgenommen. Nach 20 Stunden bei 0°C wurden die kompetenten Zellen transformiert (Dagert und Ehrlich, 1979). Zu 100 µl der Zellsuspension wurden 0,1 - 1 µg Plasmid-DNA in 100 µl 100 mM Tris-HCl pH 7,1 gegeben und vorsichtig vermischt. Die Suspension wurde 40 Minuten bei 0°C inkubiert und dann 3 Minuten in einem 42°C Wasserbad erhitzt. Nach Zugabe von 0,8 ml LB, das auf 37°C vorgewärmt war, wurden die Zellen unter leichtem Schütteln bei 37°C 1 Stunde lang inkubiert, um die Antibiotikaresistenz entwickeln zu können. 50-200 µl der Kultur wurden dann auf LB-Agarplatten mit 100 mg Ampicillin/l ausplattiert. Die Stämme HB 101 und SK 375 wurden mit 2 Ausnahmen gleich behandelt, die 100 ml - Kulturen wuchsen bis zur Dichte OD_{600} = 0,5 - 0,6 und die Zellsuspension wurde nach der Zugabe der DNA nur 20 Minuten auf Eis gehalten.

2.5 Elektrophorese

2.5.1 Nichtdenaturierende Gele

2.5.1.1 Agarosegele

DNA im Größenbereich von 20.000 bis 200 bp wurde in 0,7 - 2,5% Agarosegelen aufgetrennt. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1 * TA verwendet (40 mM Tris-HCl pH 7,8; 20 mM Natriumacetat; 2 mM EDTA). Die DNA wurde vor dem Auftragen

meist 5 Minuten bei 65°C inkubiert und mit 1/5 Volumen 5 * Blue juice versetzt (0,1% Bromphenolblau; 0,1% Xylen-Cyanol; 5% Ficoll 400 in 5 * Elektrophoresepuffer). Für Routineuntersuchungen wurden horizontale "Minigele" in der Größe 0,4 * 4,5 * 7 cm benutzt. Für präparative Zwecke, Hybridisierungen, und wenn eine möglichst hohe Auflösung erzielt werden sollte, wurden 16 * 19 cm große vertikale Gele von 2-4 mm Dicke gegossen. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei ca. 5-10 V/cm in den Minigelen und bei 2-5 V/cm in den Vertikalgelen. Minigele wurden meist mit 0,2-1 µg DNA pro Slot beladen, präparative Gele je nach Bedarf mit bis zu 150 µg DNA pro cm Gelbreite.

2.5.1.2 Polyacrylamidgele

DNA im Größenbereich von 500 bis 20 bp wurde in vertikalen 3,5-12% Polyacrylamidgelen unterschiedlichen Formates aufgetrennt (19/1 Acrylamid / Bisacrylamid). Gel- und Laufpuffer war TBE (100 mM Tris-borat; 2 mM EDTA; pH 8,3). Die Gellösung wurde nach dem Entgasen mit 1/200 Volumen 10% APS und 1/2000 Volumen TEMED polymerisiert. Als Probenpuffer wurde 0,1% Bromphenolblau; 0,1% Xylen-Cyanol; 5% Ficoll 400 in 5 * TBE verwendet. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 5-10 V/cm (Maniatis et al., 1975).

2.5.2 Denaturierende Gele

2.5.2.1 Glyoxalgele für RNA

RNA, die mit radioaktiven Proben hybridisiert werden sollte, wurde in 1,5% Agarosegelen in 10 mM Natriumphosphat pH 7,0 aufgetrennt. Die in TE gelöste RNA- (5-10 µg in ca. 5 µl) oder DNA-Probe wurde mit 2,5 Volumina Glyoxallösung (25 µl 10 * Elektrophoresepuffer; 28 µl Glyoxallösung, entionisiert; 125 µl DMSO) versetzt und 15 Minuten (RNA) oder 20 Minuten (DNA) bei 60°C denaturiert (McMaster & Carmichael, 1977). Nach Zugabe von ¼ Volumen Probenpuffer (50% Glycerin; 0,05% Bromphenolblau in 0,5 * Elektrophoresepuffer) wurden die Proben bei ca 3-7 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Acridinorange (30 µg/ml) angefärbt.

2.5.2.2 Polyacrylamid/Harnstoff - Gele für Sequenzierproben und RNA

Sequenziergele (0,25 * 300 * 400 mm) wurden nach Sanger et al. (1977) und Maxam & Gilbert (1977, 1980) hergestellt. Als Gel- und Laufpuffer wurde TBE verwendet (2.5.2). 6% oder 8% Acrylamidlösung (19/1 Acrylamid/Bisacrylamid) wurde mit 7 M Harnstoff versetzt und mit 1/200 Volumen 10% APS und 1/2000

Volumen TEMED polymerisiert. Die Proben wurden vor dem Auftragen 5 Minuten in 90% Formamid, 0,25 mM EDTA, 0,06% Bromphenolblau und 0,06% Xylen-Cyanol in 1 * TBE bei 90°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Stromstärke (16 - 20 mA). Die denaturierenden Polyacrylamidgele für RNA unterschieden sich von den Sequenziergelen lediglich durch das Format (2 * 160 * 190 mm). Diese Gele wurden mit 0,5 - 5 µg RNA pro Slot beladen, die Auftrennung erfolgte bei 10 V/cm.

2.5.3 Anfärben der Gele

Die Gele (außer Agarose/Glyoxal- und Sequenziergelen (2.5.2.1; 2.5.2.2) wurden nach dem Lauf 5-15 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (ca. 1 µg Ethidiumbromid pro ml Laufpuffer) angefärbt. Die durch ultraviolettes Licht induzierte Fluoreszenz der DNA-Ethidiumbromidkomplexe wurde anschließend auf einer UV-Platte (λ = 230 nm) beobachtet und durch ein rotes Interferenzfilter fotografiert (Polaroid Land Film Type 665 und 667).

2.5.4 Elution von DNA aus Agarosegelen

DNA aus präparativen Agarosegelen wurde elektrophoretisch eluiert (Mc Donnel et al., 1977). Die betreffenden Banden wurden nach Anfärben des Gels mit einer Rasierklinge ausgeschnitten und in einen Dialyse-Schlauch mit wenig 0,1*TBE gegeben. Der Schlauch wurde senkrecht zur Spannungsrichtung in eine horizontale Elektrophoresekammer mit 0,1 * TBE gelegt und die DNA bei 300 V ca. 3 Stunden aus dem Agarosestück eluiert. Danach wurde das elektrische Feld 3 Minuten umgekehrt, um die DNA von der Schlauchwand zu lösen, der Puffer aus dem Schlauch entnommen und die DNA nach zweifacher Phenolextraktion in Ethanol gefällt.

Eine andere Methode wurde angewendet, wenn schnell DNA isoliert werden sollte oder um Proben, die für Hybridisierungszwecke eingesetzt werden sollten, zu isolieren: Die ausgeschnittenen Agarosestücke wurden durch eine dünne Kanüle gepresst, um die Agarose zu homogenisieren. Nach zwei- bis dreimaligem Einfrieren und Auftauen wurde die DNA mit Phenol extrahiert und in Ethanol gefällt.

2.6 Transfer von DNA und RNA auf Filter

2.6.1 DNA-Dot-Blot

Makronukleus-DNA oder Plasmid-DNA wurde für quantitative Hybridisierungsexperimente direkt auf Biodyne™ A Nylonmembranfilter aufgetragen. Mittels einer Pipette wurden maximal 2 µl der DNA-Lösung auf die Filter getüpfelt. Reichte die Konzentration der DNA nicht aus, so wurde die Lösung auf dem Filter mit einem Fön eingetrocknet und dann erst weitere DNA-Lösung auf dieselbe Stelle getüpfelt. Die DNA wurde denaturiert, indem die Membran 5 Minuten auf mit Denaturierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) gesättigtes Filterpapier gelegt wurde, anschließend wurde auf dieselbe Weise denaturiert (3 M Natriumacetat pH 5,5). Die Filter wurden dann 30 Minuten luftgetrocknet und 1 Stunde bei 80°C in einem Vakuumofen gebacken. In Folienschläuche eingeschweißt, konnten sie bei 4°C bis zur Hybridisierung aufbewahrt werden.

2.6.2 Southern - Transfer

In Agarosegelen aufgetrennte DNA wurde nach der Vorschrift von Southern (1975) auf Biodyne™ A - Filter (PALL) transferiert. Die DNA wurde im Gel in 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl denaturiert (30 Minuten), in 3 M Natriumacetat neutralisiert (30 Minuten) und in 20 * SSC 4-12 Stunden transferiert. Nach dem Transfer wurden die Filter 1 Stunde bei 80°C im Vakuum gebacken. (Ein DNA-Transfer wurde nur durchgeführt, wenn die zu hybridisierenden DNA-Fragmente kleiner als 500 bp waren, ansonsten wurde direkt im Gel hybridisiert (2.7.1).

2.6.3 Northern -Transfer

RNA aus Agarose/Glyoxal - Gelen wurde direkt nach der Elektrophorese auf Nitrocellulose-Filter (Schleicher & Schüll, BA 85) übertragen. In 20 * SSC wurde ca. 8 Stunden bei 4°C transferiert (Thomas, 1980). Danach wurden die Filter 1 Stunde bei 80°C im Vakuum gebacken.

2.6.4 Kolonietransfer auf Filter

Die Kolonie-Hybridisierung auf Filtern erfolgte nach Grunstein und Wallis (1979). Dazu wurden runde Biodyne™ A Nylonfilter (PALL) auf die Agarplatten mit den zu untersuchenden Bakterienkolonien gelegt und nach 30 Sekunden wieder vorsichtig mit der Pinzette abgezogen. Die Filter wurden mit der Kolonieseite nach oben auf frische Agarplatten gelegt und bei 37°C inkubiert

bis die Kolonien sichtbar wurden. Die Filter wurden abgezogen, mit der Kolonieseite nach unten auf mit Denaturierungslösung (1.5 M NaCl; 0,5 M NaOH) getränktes Filterpapier (Whatman 3MM) gelegt und 5 Minuten denaturiert. Auf dieselbe Weise wurde anschließend neutralisiert (5 Minuten in 3 M Natriumacetat). Nach 15 Minuten Lufttrocknung wurden die Filter 1 Stunde bei 80°C im Vakuum gebacken und anschließend hybridisiert (2.7.3).

2.7 Hybridisierungen

2.7.1 Gelhybridisierungen

DNA-Fragmente über 500 bp Länge wurden direkt im Gel, ohne Transfer auf Filter, hybridisiert (Shinnik et al., 1975).

2.7.1.1 Vorbereitung der Gele

Die Agarosegele wurden nach dem Anfärben mit Ethidiumbromid und Fotografieren (2.5.3) auf einem Vakuumgeltrockner bei 60°C 1-2 Stunden, je nach Dicke des Gels, getrocknet, 10 Minuten in 0,5 M NaOH und 150 mM NaCl denaturiert und weitere 10 Minuten in 0,5 M Tris-HCl pH 7,6 und 150 mM NaCl neutralisiert.

2.7.1.2 Hybridisierungsbedingungen

Hybridisier-Mix:
- 5 * SSC (0,75 M NaCl; 0,075 M Natriumcitrat)
- 10 * Denhardt's (0,2% (w/v) Ficoll (MW 400.000); 0,2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon (MW 360.000))
- 0,2% (w/v) BSA
- 0,1% SDS
- 100 µg/ml beschallte und denaturierte E. coli DNA

Die Lösung wurde zur Zerstörung von Nukleaseaktivitäten mit 1/1000 Volumen DEP (Baycovin®) versetzt und 1 Stunde kräftig gerührt, dann auf 65°C erhitzt und bei dieser Temperatur nochmals 30 Minuten gerührt, um das DEP wieder zu entfernen. Etwa 10 ml dieser Lösung wurde zu dem in Folie eingeschweißten Gel gegeben und 2-3 Stunden im Schüttelwasserbad bei 60°C vorhybridisiert.

Dann wurde die Lösung abgegossen, ca. 5 ml frische Hybridisierlösung und die durch Nicktranslation radioaktiv markierte (2.7.1) und durch Hitze denaturierte DNA-Probe dazugegeben und weitere 24-48 Stunden bei 64°C inkubiert. Nicht hybridisierte Probe wurde anschließend in einer absteigenden Reihe von SSC entfernt (jeweils ½ Stunde in 4 *, 2 *, 1 * und 0,5 * SSC bei 60°C). In manchen Fällen wurde bis 0,1 * SSC gewaschen, um den Background zu verringern.

2.7.2 Filterhybridisierungen

Die Hybridisierungsbedingungen für Filter stimmen mit denen für Gele überein. Es genügte hier jedoch eine Vorhybridisierungszeit von 1 Stunde.

2.7.3 RNA-Hybridisierungen

Die Bedingungen zur Hybridisierung filtergebundener RNA waren identisch, es wurde lediglich bei 60°C hybridisiert und jeweils einmal mit 4 * SSC und 2 * SSC mit 0,1% SDS gewaschen.

2.7.4 Autoradiographie

Die Radioaktivität auf Gelen und Filtern wurde durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Röntgenfilme (Kodak X-Omat S, 18 * 24 cm; Agfa Curix RP1, 30 * 40 cm wurden auf die mit Haushaltsfolie bedeckten Gele und Filter gelegt und in einer Röntgenfilm-Kassette exponiert. Bei schwacher Aktivität wurde eine Verstärkerfolie (Cronex Quanta III) hinter den mit einem schwachen Lichtblitz sensibilisierten Röntgenfilm gelegt und bei -70°C exponiert. Die Filme wurden mit handelsüblichen Röntgenfilm - Entwicklern und - Fixierern nach den Angaben der Hersteller weiterbehandelt.

2.8 DNA-Klonierungen

2.8.1 Entfernung von 3'-Überhängen mit Bal 31

2 µg DNA wurden in einem Endvolumen von 20 µl in 1 * Bal 31-Puffer mit 0,5 µg/µl BSA bei 0°C mit 0,05 units der Exonuklease Bal 31 verdaut. Die Reaktion wurde mit $^1/_{20}$ Volumen 0,5 M EDTA pH 8,0 nach 1 Minute gestoppt und die DNA zweimal mit Phenol und zweimal mit Chloroform extrahiert und in Ethanol ausgefällt. Unter diesen Bedingungen wurden die 5'-Enden zum größten Teil nicht angegriffen.

2.8.2 Auffüllen der 3'-Enden mit Klenow-Polymerase

Die rezessiven 3'- Enden, die durch den Bal 31 - Verdau entstanden, wurden durch das große Fragment der Polymerase I (Klenow-Fragment) wieder aufgefüllt. Durch den Einbau radioaktiv markierter Desoxynukleotide konnte die Reaktion überprüft werden (2.10.1.4). Die Reaktionslösung enthielt 1-5 µg DNA in 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 250 µg/ml BSA, je 0,3 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP und 5 units Klenow-Enzym. Das Reaktionsgemisch wurde 60 Minuten bei 22°C inkubiert und die Reaktion danach mit $^1/_{20}$ Volumen 0,5 M EDTA pH 8,0 gestoppt. Die freien Nukleotide wurden durch drei Fällungen in Ethanol (je 20 Minuten bei -70°C) entfernt.

2.8.3 Vorbereitung der Linker

Die Pst I-Linker mußten vor der Ligation mit der Makronukleus-DNA phosphoryliert werden. In 10 µl Volumen wurden 1 µg Linker in 70 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 0,5 mM ATP, 10 µCi γ-^{32}P-ATP (3000 Ci/mmol) und 8 units Polynukleotidkinase 60 Minuten bei 37°C inkubiert. $^1/_{10}$ des Ansatzes wurde in 10 µl Volumen in 60 mM Tris-HCl pH 7,6, 6 mM $MgCl_2$, 0,6 mM DTT, 0,1 mM ATP und 2 units T_4-DNA Ligase über Nacht bei 4°C ligiert und die Ligation auf einem 12% Polyacrylamidgel getestet (2.5.1.2).

2.8.4 Vektorpräparierung

Die Vektoren pUC 12 und pGEM wurden mit den gewünschten Restriktionsenzymen linearisiert. Um eine Rezirkularisierung des Vektors bei der Ligation zu verhindern, wurden die 5'-Enden dephosphoryliert. Bis zu 20 µg DNA wurden in 50 µl Endvolumen in 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0 mit 0,1 µl alkalischer Phosphatase (CIP) 60 Minuten bei 54°C inkubiert. Das Enzym wurde durch Zugabe von $^1/_{10}$ Volumen 100 mM EGTA pH 7,0 und Inkubation bei 65°C (30 min) inaktiviert und durch eine anschließende Phenolextraktion entfernt. Wurde der Vektor mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, so wurde das entstehende kurze Polylinkerfragment im einem präparativen Agarosegel vom Vektor getrennt und dieser aus dem Gel eluiert (2.5.4). Bei Subklonierungen in doppelt geschnittene Vektoren wurde oft auf die Abtrennung des Polylinkerfragmentes und die Dephosphorylierung verzichtet, dabei aber das Ligationsvolumen und/oder die Konzentration des Inserts erhöht (2.8.5).

2.8.5 Ligationen

2.8.5.1 Linker-Insert Ligation

Die phosphorylierten Linker (2.8.3) wurden in 5-fachem molarem überschuß mit T_4-DNA Ligase an die wie in 2.8.1. und 2.8.2 beschrieben 'blunt-end' gemachte Makronukleus-DNA ligiert. Der Reaktionsansatz (2 µg Makronukleus-DNA der Größe 2000 bp; 0,1 µg phosphorylierte Linker; 60 mM Tris-HCl pH 7,6; 6 mM $MgCl_2$; 0,6 mM DTT; 0,1 mM ATP und 1 unit T4-DNA Ligase in 20 µl Endvolumen) wurde 4 Stunden bei 20°C inkubiert und die Reaktion durch Erhitzen (10 min, 65°C) gestoppt. Nach Phenolextraktion und Ethanolfällung wurde die DNA mit Pst I verdaut (2.9.2) und die abgeschnittenen Linkerfragmente durch Säulenchromatographie über Sephadex-G-20 medium von der Makronukleus-DNA abgetrennt (Maniatis et al., 1982).

2.8.5.2 Vektor-Insert Ligation

'Sticky-end'-Ligationen wurden bei 20°C, 'blunt-end'-Ligationen bei 4°C in 60 mM Tris-HCl pH 7,6; 6 mM $MgCl_2$; 0,6 mM DTT; 0,1 mM ATP durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten 0,01-0,5 µg DNA pro µl, das molare Verhältnis von Insert zu Vektor betrug normalerweise 2:1. Wenn bei Subklonierungen mit nicht dephosphorylierten Vektoren gearbeitet wurde (vgl. 2.8.4), so wurden die molaren Verhältnisse zugunsten des Inserts verändert (bis 5:1) und/oder das Ligationsvolumen erhöht. Pro µg DNA wurden 0,05 units ('sticky ends') bis 0,5 units ('blunt ends') T4-DNA Ligase eingesetzt.

2.9 Anwendung von Nukleasen

2.9.1 DNase I

DNA wurde aus RNA-Präparationen durch 20 minütige Inkubation mit 50 units DNase I (RNase-frei, PL) pro ml RNA Lösung bei 37°C in 40 mM Tris-HCl pH 7,6; 6 mM $MgCl_2$ abgebaut.

2.9.2 Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die enzymatischen Spaltungen von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgten unter den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen. Die Konzentration der DNA in den Reaktionsansätzen wurde zwischen 0,05 und 0,4 µg/µl gehalten. Pro µg eingesetzter DNA wurden 0,1 bis 10 units (entsprechend der Unitdefinition für die verschiedenen Enzyme) eingesetzt. Die Reaktionen wurden durch Er-

hitzen der Proben für 5 Minuten auf 65°C gestoppt. Nicht hitzeinaktivierbare Enzyme (z.B. Bam H I) wurden durch eine Phenolextraktion entfernt.

2.9.3 RNase

RNA wurde aus DNA-Präparationen oder nach Zugabe von tRNA vor dem Fällen geringer DNA Mengen in großen Volumina durch einen RNase Verdau entfernt. Dazu wurde eine Mischung aus pankreatischer RNase (1 mg/ml) und RNase T_1 (10.000 units/ml) verwendet. Die pankreatische RNase war zuvor dreimal auf 100°C (5 min) erhitzt worden, um DNasen zu zerstören. Die DNA-Lösung wurde bei 37°C 15-60 Minuten mit 1/50 Volumen der RNase-Mischung inkubiert. Die Enzyme wurden anschließend durch eine Phenolextraktion entfernt.

2.9.4 Spezifische RNasen

Für die Untersuchung der poly(A)$^+$-Fraktion der *Stylonychia* RNA wurde am 3'-Ende radioaktiv markierte RNA (2.10.2.2) mit spezifisch schneidenden RNasen (RNase A, RNase T_1, RNase U_2) verdaut (Donis-Keller et al., 1977). Die T_1-Reaktionen wurden in 30 mM Tris-HCl pH 7,6 bei 37°C (40 min), die RNase A Verdaue in 10 mM Tris-HCl pH 7,6 bei Raumtemperatur (20 min) durchgeführt. Der radioaktiven RNA wurde stets nichtmarkierte carrier-RNA zugesetzt, um genügend hohe RNA Konzentrationen zu erhalten. Die Reaktionsansätze enthielten in 30-50 µl Endvolumen 5-15 µg RNA. Pro 5 µg RNA wurden 7 units RNase T_1 oder 20 ng RNase A eingesetzt.

2.10 Radioaktive Markierungen von DNA und RNA

2.10.1 DNA - Markierungen

2.10.1.1 Nicktranslation der DNA

Ein µg DNA wurde in 50 µl Volumen nach Maniatis et al. (1982) radioaktiv markiert. Die Reaktionslösung enthielt je 10 µM dATP, dTTP und dGTP, 20-40 µCi α-^{32}P-dCTP (6000 Ci/mol; Amersham), 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 250 µg/ml BSA und 50 pg DNase I. Nach Zugabe von 5-10 u DNA-Polymerase I wurde 3 Stunden bei 12-15°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/5 Volumen 20% SDS gestoppt und die freien Nukleotide durch Säulenchromatographie in einer Minisäule (Sephadex-G-50 fine) abgetrennt (Maniatis et al., 1982).

2.10.1.2 5'-Endmarkierung (Kinase)

DNA wurde nach Dephosphorylierung der 5'-Enden (2.8.4) durch die T_4 Polynukleotidkinase mit γ-^{32}P-ATP markiert. 5-20 µg DNA wurden in einem Endvolumen von 20-30 µl im 70 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM $MgCl_2$ und 5 mM DTT mit 10-30 µCi γ-^{32}P-ATP und 5-10 units Enzym 40 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Umfällen der DNA in Ethanol gestoppt. Wenn nötig, wurden die freien Nukleotide durch weitere Umfällungen oder durch Säulen-Chromatographie (2.10.1.1) entfernt.

2.10.1.3 3'-Endmarkierung (TdT)

Die 3'-Enden der DNA wurden durch Addition eines α-^{32}P-ddAMP Restes mittels der Terminalen Desoxynukleotidyl Transferase (TdT) radioaktiv markiert. 10 µg DNA wurden in 75 µl Endvolumen in 140 mM Kaliumcacodylat pH 6,0; 1 mM CoCl; 1 mM DTT; 30 mM Tris-base mit 30 µCi α-^{32}P-ddATP und 20 units Enzym bei 37°C inkubiert. Nach 50 Minuten wurde das Reaktionsvolumen auf 125 µl erhöht und nochmals 50 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/20 Volumen 0,5 M EDTA pH 8,0 gestoppt und die DNA in Ethanol gefällt.

2.10.1.4 3'-Markierung (Klenowfragment)

Rezessive 3'-Enden wurden durch die große Untereinheit der Polymerase I (Klenow-Fragment) aufgefüllt und gleichzeitig radioaktiv markiert. Die Standardreaktion enthielt in 50 µl Endvolumen 66 mM Glycin-NaOH pH 9,2; 6 mM $MgCl_2$; 1 mM β-Mercaptoethanol, 30 µM dNTP (alle Nukleotide außer den radioaktiven); 10-30 µCi α-^{32}P-dATP und/oder 10-30 µCi α-^{32}P-dCTP; 5-20 µg DNA und 1-10 units Enzym. Die Reaktionslösung wurde 30-60 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend phenolisiert und die DNA in Ethanol gefällt. Diese Reaktion wurde verwendet, um Restriktionsfragmente am 3'-Ende für Sequenzierreaktionen zu markieren und auch um den Einbau der Nukleotide in Auffüllreaktionen (z.B nach Bal 31-Verdau) zu überprüfen.

2.10.1.5 Markierung der Sequenzierproben nach Sanger et al. (1977)

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Endmarkierungen und der Nicktranslation wurde hier ein Präparat mit niedrigerer spezifischen Aktivität eingesetzt (α-^{32}P-dATP, >400 Ci/mol; 2.11.2).

2.10.2 RNA - Markierungen

2.10.2.1 5'-Endmarkierung

Die Kinasereaktionen wurden analog zu 2.10.1.2 durchgeführt.

2.10.2.2 3'-Endmarkierungen

RNA wurde am 3'-Ende mit 5'-^{32}P-pCp durch die RNA-Ligase markiert. Der Reaktionsansatz enthielt in 20 µl Volumen 50 mM HEPES pH 7,5; 15 mM $MgCl_2$; 3,3 mM DTT; 10% DMSO; 0,01 mg/ml BSA; 30 µM ATP; 20 µCi 5'-^{32}P-pCp; 40 units RNA-Ligase und 5-20 µg RNA. Die Reaktionslösung wurde 4-12 Stunden bei 4°C inkubiert und anschließend phenolisiert.

2.11 DNA-Sequenzierungen

2.11.1 Sequenzierung nach Maxam und Gilbert (1979)

2.11.1.1 Probenvorbereitung

Die zu sequenzierende DNA wurde mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten, die entstehenden Enden, je nachdem, welcher Strang gelesen werden sollte, mit der Kinase (5'-) oder der terminalen Transferase (3'-Enden) radioaktiv markiert (2.10.1.2; 2.10.1.3). Mit einem oder mehreren weiteren Restriktionsenzymen wurden sekundäre Schnitte gesetzt, so daß DNA-Fragmente entstanden, die nur an einem Ende markiert waren. Die Enzyme wurden so gewählt, daß in einem Ansatz möglichst viele und möglichst ungleich große Fragmente entstanden. Die gewünschten Fragmente wurden aus präparativen Agarosegelen eluiert (2.5.4) und in 20 µl H_2O gelöst.

2.11.1.2 Basenspezifische Reaktionen

Die Aktivität der markierten DNA wurde durch Szintillationszählung (Tscherenkov) gemessen und die Proben möglichst exakt auf 4 Eppendorf-Cups, in denen die basenspezifischen Spaltungen erfolgen sollten, verteilt (G und C jeweils 5 µl, G+A und C+T je 10 µl). Zu jedem Aliquot wurde 1 µl carrier-DNA gegeben (1 µg/µl beschallte Heringsspermien-DNA), zu G+A und C+T je 10 µl H_2O, zu C 15 µl 5 M NaCl und zu G 200 µl DMS-Puffer (50 mM Natriumcacodylat pH 8,0; 10 mM $MgCl_2$; 1 mM EDTA). Die Modifikation der Basen erfolgte durch 1 µl DMS (G: 6 min, 20°C), 2 µl Pyridinformiat pH 2,0 (G+A: 25 min, 37°C) und 30 µl Hydrazin (C+T und C: 7 min, 20°C). Bei kleineren DNA-Fragmenten (800-200 bp) wurden die Reaktionszeiten um 10-20% erhöht. Die Reaktionen wurden

durch Zugabe von "Stop-Lösungen" und sofortiges Ausfällen der DNA in Ethanol bei -70°C gestoppt (G: +50 µl DMS-Stop [1,5 M Natriumacetat; 1 M β-Mercaptoethanol; 100 µg/ml tRNA] +750 µl Ethanol. C+T und C: +200 µl Hydrazin-Stop [0,3 M Natriumacetat; 0,1 mM EDTA; 25 µg/ml tRNA] + 750 µl Ethanol), die G+A Reaktion wurde lediglich eingefroren (15 Minuten im Trockeneis) und lyophilisiert. Die gefällte DNA wurde pelletiert und nochmals gefällt (+250 µl 0,3 M Natriumacetat pH 7,0 + 750 µl Ethanol), danach wieder zentrifugiert und getrocknet. Die trockenen Proben und die lyophilisierte G+A Reaktion wurden in 100 µl 1 M Piperidin gelöst und 30 Minuten bei 90°C inkubiert, danach eingefroren und über Nacht im Speed-Vac-Concentrator (Abimed) lyophilisiert. Nach dem folgenden Pipettierschema konnten 4 verschiedene Fragmente gleichzeitig sequenziert werden:

Reaktion:	G	G+A	C+T	C
DNA:	5 µl	10 µl	10 µl	5 µl
carrier-DNA:	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
H_2O:		10 µl	10 µl	
DMS-Puffer:		200 µl		
5 M NaCl:				15 µl

t(min)			
0	G+A	+ 2 µl Pyridinformiat	37°C
2	G	+ 1 µl DMS	20°C
4	C+T	+ 30 µl Hydrazin	20°C
6	C	+ 30 µl Hydrazin	20°C
8	G	+ 50 µl DMS-Stop 750 µl Ethanol	-70°C
11	C+T	+200 µl Hz-Stop 750 µl Ethanol	-70°C
13	C	+200 µl Hz-Stop 750 µl Ethanol	-70°C
20	G+A	einfrieren	-70°C
25	G, C+T, C	zentrifugieren	
30	G+A	lyophilisieren	
35	G, C+T, C	dekantieren, +250 µl Na-ac +750 Ethanol	-70°C
45	G, C+T, C	zentrifugieren	
55	G, C+T, C	dekantieren, trocknen	
65	alle Proben:	+100 µl 1 M Piperidin, 30 min 90°C 10 min -70°C, lophilisieren	

Nach der Lyophilisierung wurden dreimal jeweils 10 µl H_2O zu den Proben gegeben und im Speed-Vac-Concentrator eingetrocknet. Dann wurde die Aktivität der Proben im Szintillationszähler gemessen (Tscherenkov) und die DNA in Proben-Puffer (80% Formamid; 50 mM Tris-HCl pH 8,3; 1 mM EDTA; 0,1% Bromphenolblau; 0,1% Xylen-Cyanol) gelöst. Die Menge wurde so gewählt, daß alle vier Proben dieselbe Aktivität pro Volumeneinheit aufwiesen (durchschnittlich 1000-10000 cpm/µl).

2.11.1.3 Sequenzelektrophorese

Die Herstellung des Sequenzgels ist in 2.5.2.2 beschrieben. Das Gel wurde bei 1800 V vorelektrophoresiert, um eine gleichmäßige Temperatur zu erreichen, dann wurden 1-2 µl der kurz auf 80°C erhitzten Proben (bis 20000 cpm) aufgetragen und bei konstanter Stromstärke von 16 mA elektrophoresiert. Nachdem die Bromphenolblau-Front das Gel verlassen hatte, wurde die nächste Ladung aufgetragen. (Das Gel wurde maximal viermal geladen, unter günstigen Umständen konnten so ca. 350 Basen fortlaufend gelesen werden). Nach dem Lauf wurde das Gel auf Filterpapier (Whatmann 3MM) von der Glasplatte abgezogen, mit Folie bedeckt und eine Autoradiographie hergestellt (2.7.5).

2.11.2 Sequenzierung nach Sanger et al. (1977)

Die enzymatische Sequenzierung wurde mit einem käuflichen Sequenzierkit durchgeführt (GEMSeq™ Riboprobe Gemini™ Sequencing System; Promega Biotec, Madison). Das pGEM Plasmid besitzt einen Polylinker, in den Fragmente der zu sequenzierenden DNA kloniert werden können. In dessen direkter Nachbarschaft befinden sich universelle Primersequenzen (T_7-und SP_6-Promotor), an die die synthetischen Oligonukleotidprimer hybridisiert werden konnen, die als Startstellen für die enzymatische Synthese der DNA durch das Klenow-Fragment dienen. Durch Didesoxynukleotide im Reaktionsgemisch werden spezifische Strangabbrüche erreicht. An 1 µg des linearisierten Plasmids wurden durch Denaturierung (5 min, 100°C) und schnelles Abkühlen auf Eis 30 ng Primer hybridisiert (in 100 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM NaCl, Endvolumen 10 µl). Die Lösung wurde nach Zugabe von 40 µCi α-^{32}P-dATP (>400 Ci/mol) in 4 Aliquots (G,A,T,C) aufgeteilt und mit dem entsprechenden "Nukleotid-Mix" (dNTPs/ddNTP) und 1 unit Klenow - Enzym 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Chase-Reaktion mit erhöhter dNTP-Konzentration (2 mM; 15 min, 37°C), die durch Zugabe von 5 µl Proben-Puffer (2.11.1.2) gestoppt wurde. Nach

Denaturierung (5 min, 90°C) wurden Aliquots der vier Reaktionen direkt auf ein Sequenziergel geladen (2.11.1.3).

2.12 c-DNA-Synthese

2.12.1 Synthese des ersten Stranges

Die cDNA Synthese erfolgte im Wesentlichen nach Gubler und Hoffmann (1983). Die Reaktionslösung für die Synthese des ersten Stranges enthielt in 20 µl Endvolumen 15 µg Gesamt-RNA (2.3.1) oder 5 µg poly A^+-RNA (2.3.3); 50 mM Tris-HCl pH 8,3; 15 mM $MgCl_2$; 10 mM DTT; 4 mM Natriumpyrophosphat; je 1 mM dATP, dTTP, dGTP; 0,5 mM dCTP; 10 µCi α-^{32}P-dCTP (>400 Ci/mol); 0,1 µg/µl oligo $(dT)_{12-18}$; 20 units HPRI und 30 units MuLV-Reverse Transcriptase. Die Lösung wurde 60 Minuten bei 42°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 1/20 Volumen 0,5 M EDTA pH 8,0 gestoppt. Nach zweifacher Phenolextraktion wurde in Ethanol gefällt.

2.12.2 Synthese des zweiten Stranges

Die Reaktionsprodukte aus 2.12.1 wurden in H_2O gelöst, die RNA in DNA-RNA-Hybriden durch RNase H partiell genickt und der zweite Strang durch die Polymerase I, geprimt durch die entstehenden RNA-Fragmente, synthetisiert. Der Reaktionsansatz enthielt in 100 µl Endvolumen den in H_2O gelösten ersten Strang der cDNA, 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM $MgCl_2$; 10 mM $(NH_4)_2SO_4$; 100 mM KCl; 0,15 mM β-NAD; 0,05 mg/ml BSA, 1 unit RNase H; 30 units DNA-Polymerase I und 1 unit *E. coli*-Ligase. Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 12°C und nochmals 1 Stunde bei 22°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/20 Volumen 0,5 M EDTA pH 8,0 gestoppt. Die restliche RNA wurde durch RNase entfernt, die Lösung zweimal phenolisiert und die cDNA in Ethanol gefällt.
Die Syntheseprodukte aus 2.12.1 und 2.12.2 wurden stets durch Polyacrylamidelektrophorese überprüft (2.5.2.2).

2.12.4 Klonierung der cDNA

Die cDNA wurde entweder durch Restriktionsenzyme, deren Erkennungssequenz in der β-Tubulingensequenz auftreten, geschnitten und in kompatible Restriktionsstellen des Vektors pUC 12 kloniert oder durch Bal 31-Verdau und anschließendes Auffüllen mit dem Klenow-Enzym "blunt end" gemacht und in die SmaI-site von pUC 12 kloniert (2.8).

3 ERGEBNISSE

3.1 Klonierung der Makronukleus-DNA

3.1.1 Lokalisierung der β-Tubulingene in der Makronukleus-DNA

Makronukleus-DNA wurde in 1,5% Agarosegelen aufgetrennt (Abb. 1a), die Gele getrocknet und mit der radioaktiv markierten heterologen β-Tubulingen-Probe aus dem Hühnchen (Valenzuela at al., 1981) hybridisiert. Die Makronukleus-DNA zeigte nur in einer Größenklasse (1,85 kbp) eine Hybridisierung mit der Probe (Abb. 1b, Spur A). Wurde die Makronukleus-DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, so zeigte sich, daß die hybridisierende DNA aus mindestens zwei Typen von Molekülen besteht, die sich in den Erkennungsstellen der Restriktionsenzyme unterscheiden (Abb. 1b, B-G). Die Analyse der entstehenden Banden zeigte weiterhin, daß sich die beiden Molekültypen oft nur geringfügig in der Lokalisation der Erkennungsstellen für ein bestimmtes Restriktionsenzym unterscheiden (Bam H I, Eco R I, Pvu II). Andere Enzyme dagegen schneiden nur in einem der beiden Typen, während der andere unverdaut bei 1,85 kbp verbleibt (z.B. Hind III).
Da in keinem der Typen eine Erkennungsstelle für das Enzym Pst I vorliegt, konnten sämtliche Moleküle, die für β-Tubulin kodieren, mittels Pst I - Linker in voller Länge kloniert werden.

3.1.2 Anreicherung und Klonierung der β-Tubulingene

Ein praparatives Agarosegel wurde nach dem Lauf in 5 mm breite Streifen geschnitten und die DNA daraus eluiert (2.5.4). Ein Aliquot der verschiedenen DNA-Fraktionen wurde in einem 1% Agarosegel aufgetrennt (Abb. 2a), das Gel wurde anschließend getrocknet und mit dem Hühnchen β-Tubulin hybridisiert. Die Fraktion, die die stärkste Hybridisierung zeigte, wurde für das folgende Klonierungsexperiment eingesetzt (Abb. 2b). Die DNA wurde wie in 2.8.1 beschrieben mit der Exonuklease Bal 31 verdaut, um die 3'-überhänge der Makronukleus-DNA zu entfernen. Die nachfolgende Einbau-Reaktion durch das Klenowfragment wurde durch Einsatz radioaktiv markierter Nukleotide kontrolliert (2.10.1.4). An die nun 'blunt end'-Moleküle wurden die phosphorylierten Linker in 5-fachem überschuß anligiert. Die erfolgreiche radioaktive Phosphorylierung der Linker wurde durch eine Testligation und anschließende

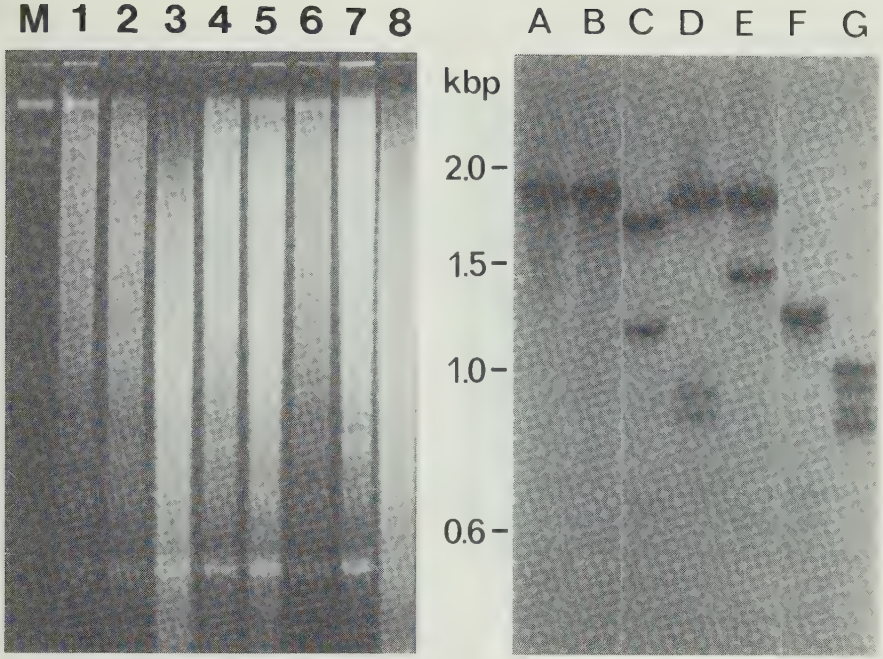


Abb. 1: Identifizierung und Charakterisierung der β-Tubulingene in der Makronukleus-DNA von *S. lemnae*. Native und restringierte Makronukleus-DNA (jeweils 6 µg) wurde in einem 2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt (a), das Gel getrocknet und mit der radioaktiv markierten heterologen β-Tubulin cDNA-Probe vom Hühnchen (Valenzuela et al., 1981) hybridisiert (b). Die Makronukleus-DNA enthält nur eine Größenklasse von Molekülen, die zu der β-Tubulin Probe homolog ist (Spur A, 1,85 kbp). Die Restriktionsverdaue zeigen, daß in dieser Größenklasse zwei verschiedene Typen von Molekülen vorliegen, die sich in einigen Restriktionsstellen unterscheiden. So besitzt zum Beispiel einer der Typen eine Erkennungsstelle für das Enzym Hind III und wird in zwei Fragmente von 0,9 und 0,95 kbp zerlegt, während der andere diese Erkennungsstelle nicht besitzt und nicht geschnitten wird (Spur D). Das Enzym Pvu II schneidet beide Typen etwa in der Mitte der Moleküle, die entstehenden Fragmente unterscheiden sich aber deutlich (1,0 + 0,85 und 0,95 + 0,9 kbp; Spur G). 1,A; Native Makronukleus-DNA; 2,B; Pst I; 3; Eco R I; 4,F; Bam H I; 5,G; Pvu II; 6; Kpn I; 7,C; Sal I; 8,D; Hind III; 9,E; Ava II; 10; Nde I; M; λ-DNA Hind III + Eco R I.

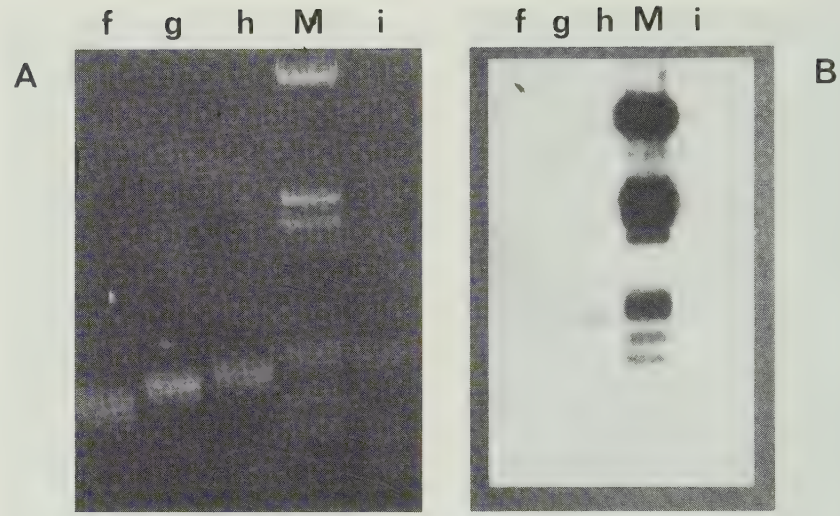


Abb. 2: Identifizierung von Makronukleus-DNA Fraktionen, die β-Tubulingene enthalten. Durch Gelelution fraktionierte Makronukleus-DNA wurde in einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (A) und mit der radioaktiv markierten Hühnchen-β-Tubulin-cDNA Probe hybridisiert (B). Die Fraktion h hybridisierte am deutlichsten und wurde für die Klonierungsexperimente eingesetzt. f-i; Makronukleus-DNA Fraktionen; M: λ-DNA Hind III / Eco R I.

Analyse auf einem 12% Polyacrylamidgel getestet. Ein Aliquot der ligierten Makronukleus-DNA wurde auf einem 1% Agarosegel getestet (Abb. 3). Die anligierten Linker wurden durch einen vollständigen Pst I Verdau aufgeschnitten und die Linkerfragmente durch Sephadex-G-20 - Chromatographie abgetrennt. Die Makronukleus-DNA wurde anschließend in die Pst I - Stelle des Vektors pUC 12 ligiert (2.8) und mit den rekombinanten Plasmiden der Bakterienstamm JM 83 transformiert (2.4.5). Ein Teil der erhaltenen Klone wurde durch Koloniehybridisierung mit dem β-Tubulinprobe aus dem Huhnchen gescreent (2.6.4).

3.1.3 Identifizierung der positiven Klone

Die heterologe Probe ermöglichte eine sichere Identifizierung der Klone, die β-Tubulingene von *S. lemnae* enthielten (Abb. 4). Die DNA aus 5 positiven

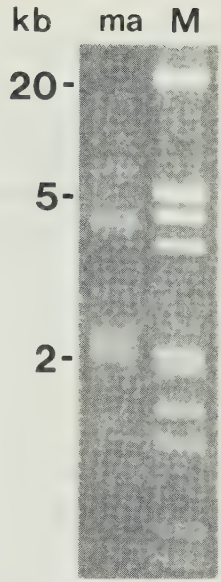
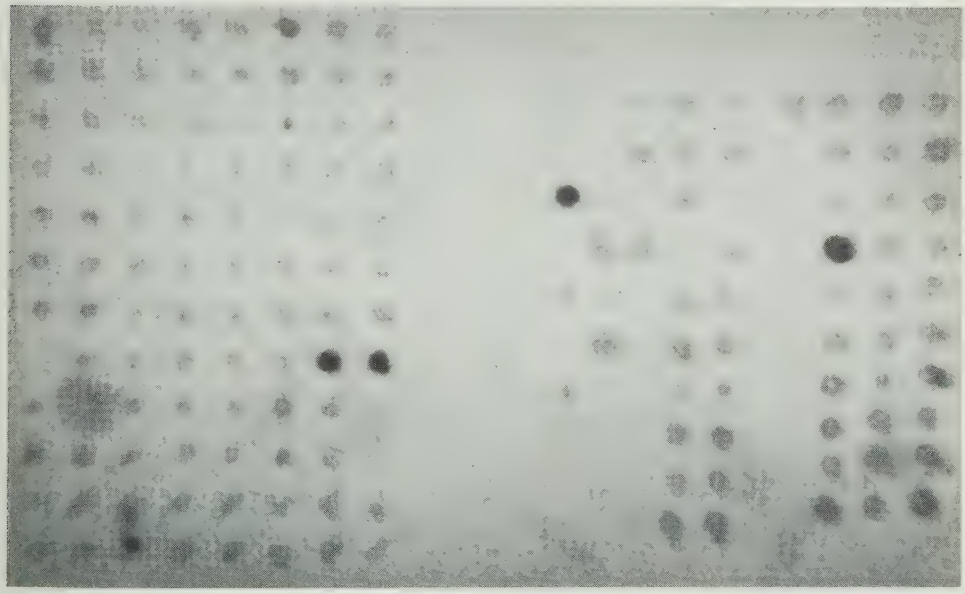


Abb. 3: Ligation der Pst I-Linker an die Makronukleus-DNA. Ein Aliquot der Ligation wurde in einem 1% Agarosegel getestet. Es sind deutlich die durch die Linkeraddition vergrößerte Bande der einfachen und mehrfachen Makronukleus-DNA-Fragmente zu erkennen (um 2, 4 und 8 kbp). ma: Ligationsprodukte M: λ-DNA Hind III / Eco R I.

Abb. 4: Identifizierung der Klone, die β-Tubulingen-Sequenzen enthalten. Die rekombinanten Klone wurden von einer Mikrotiterplatte auf Filter überstempelt und mit der radioaktiv markierten β-Tubulin Probe aus dem Hühnchen hybridisiert. Die positiven Klone zeigen eine deutliche Schwärzung.



Klonen (A6, B3, B8, C4, F4) wurde isoliert und mit verschiedenen Restriktionsenzymen, die die β-Tubulingene schneiden (vgl. 3.1.1, Abb. 1b), verdaut. Die Analyse der entstehenden Banden und die anschließende Hybridisierung der Gele mit der β-Tubulingen-Probe aus dem Hühnchen bestätigte die Ergebnisse der Koloniehybridisierung und zeigte, daß beide Typen der β-Tubulingene von *S. lemnae*, die im folgenden mit β1 (Klone A6, B3, B8, C4) und β2 (F4) bezeichnet sind, durch die Klone repräsentiert waren (Abb.5). Als praktisches Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden β-Tubulingenen diente bei den weiteren Versuchen die Hind III - Erkennungsstelle, die nur das β2 Gen aufweist (Abb. 5).

3.2 Restriktionsanalyse der β-Tubulingene

Jeweils ein Klon, der β1 und β2 repräsentierte (A6 und F4) wurde ausgewählt, um eine detaillierte Restriktionskarte zu erstellen. Dazu wurden die zirkulären Plasmide oder die isolierten Inserts mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Die daraus resultierenden Restriktionskarten der beiden Gene sind in Abb. 5 gezeigt.

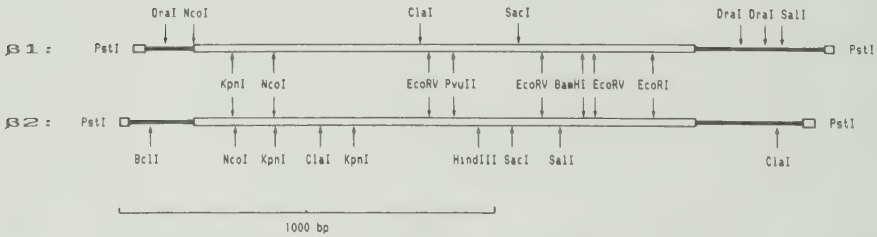


Abb. 5: Restriktionskarte der β1 und β2 Tubulingene von *S. lemnae*.
Gemeinsame Erkennungsstellen in den codierenden Regionen (weiße Balken) sind zwischen den Genen angegeben. Die weißen Kästchen an den Enden der Moleküle stellen die C_4A_4 Repeats dar, die nichtcodierenden Regionen sind schwarz gezeichnet.

Die beiden klonierten β-Tubulingene von *Stylonychia lemnae* sind mit 1850 bp (β1) und 1830 bp (β2) etwa gleich lang und weisen in der Lokalisation der

Restriktionsstellen zahlreiche Gemeinsamkeiten auf. Die Restriktionsstellen der Enzyme Kpn I, Nco I, Eco R V, Bgl II, Pvu II, Bam H I und Eco R I scheinen identisch zu sein und in β2 lediglich um ca. 40 bp verschoben. Die Vermutung lag nahe, daß der Bereich mit identischen Restriktionsstellen die codierende Region darstellte und die beiden Gene unterschiedlich lange 5'- und 3'-nichtcodierende Bereiche aufweisen. Die zusätzlichen Schnittstellen (meist im β2-Gen) zeigen aber auch deutliche Unterschiede zwischen den beiden Genen im 'codierenden Bereich'.

3.3 Sequenzierung und Sequenzanalyse der β-Tubulingene.

Die Sequenzierstrategie, die für die Reaktionen nach Maxam & Gilbert (1980) eingesetzt wurden, und die Längen der jeweils gelesenen Sequenzen sowie die DNA-Fragmente, die in pGEM subkloniert und nach Sanger et al. (1977) sequenziert wurden, zeigt Abb. 6. Unter den angegebenen Bedingungen (2.11) konnten nach beiden Methoden bis 350 bp pro sequenziertem Fragment gelesen werden.

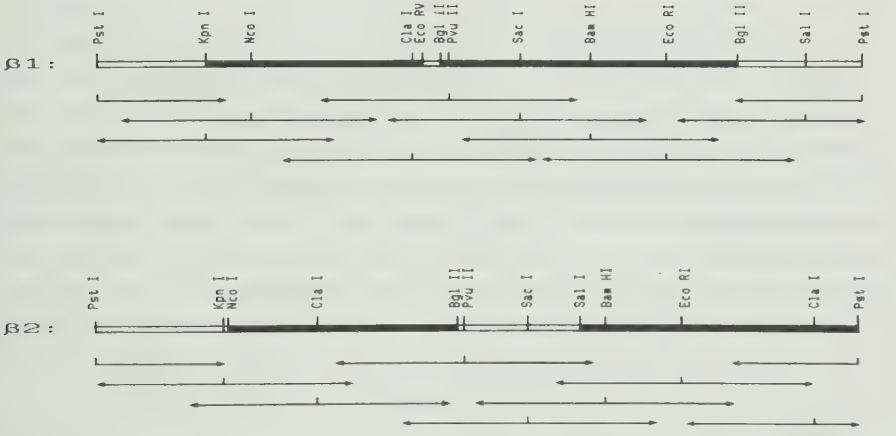


Abb. 6: Sequenzierstrategie und pGem Subklone. Die Ausgangsstellen und die Richtung der Sequenzierung nach Maxam & Gilbert (1980) sind durch die Pfeile angegeben. In pGem subklonierte Fragmente der Gene sind schwarz hervor-gehoben.

Nach Maxam & Gilbert (1980) wurden jeweils beide Stränge in voller Länge sequenziert. Sequenzabschnitte, die dann noch immer nicht eindeutig zu lesen waren und besondere Strukturen wie Replikationsorigins, TAA-Codon u.s.w. (3.4.1.1; 3.4.2.2) wurden zusätzlich nach Sanger et al. (1977) sequenziert.
Die vollständige Sequenz beider β-Tubulingene von *Stylonychia lemnae* ist in Abb. 7 angegeben.

β-1 Tubulin:

```
CCCCAAAACCCCAAAACCCCAAAACCCCATAGCACTACTAAATAGGTTTTAACTCAAATAAAATCAAGGACAACTAAATTTTAAATTCAGAGCCTGAATA  100
TAAGGATACCAATTTTAAGAAGTATTAATTATTCTTAATTTTCAAAAACAAACCATGAGAGAGATCGTACATATCCAAGGTGGTCAATGCGGTAACCAAA  200
TCGGAGCCAAGTTCTGGGAAGTCATTTCAGATGAACACGGAATTGACCCCACCGGTACCTATCACGGAGACTCTGACCTTCAACTTGAGAGAATCAACGT  300
TTACTACAACGAAGCCACCGGAGGCCGTTACGTACCAAGAGCCGTTCTCATGGACTTGGAACCAGGCACCATGGACTCTGTCAGAGCTGGCCCATTCGGT  400
CAACTCTTCAGACCAGACAACTTCGTCTTCGGTCAATCCGGAGCTGGTAACAACTGGGCCAAGGGTCACTATACCGAGGGTGCTGAGCTTATCGACTCAG  500
TCCTCGATGTTGTTAGAAAGGAAGCTGAAGGTTGCGATTGCCTCCAAGGATTCCAAATCACCCACTCACTCGGAGGTGGTACTGGTTCAGGTATGGGAAC  600
CCTCTTGATCTCCAAGGTCAGAGAAGAGTACCCAGACAGAATCATGGCTACTTTCTCAGTCGTCCCATCACCAAAGGTCTCAGATACCGTCGTTGAGCCA  700
TACAACGCCACCCTATCAGTCCATCAACTCGTCGAAAACGCTGATGAGGTTATGTGTATCGATAACGAAGCCCTCTACGATATCTGCTTCAGAACCCTTA  800
AGCTCACCACCCCAACCTACGGAGATCTTAACCACTTGGTCTCAGCTGGTATTTCAGGTGTTACATGCTGCCTCAGATTCCCAGGTCAATTGAACTCTGA  900
TCTCAGAAAGTTGGCTGTCAACCTTATTCCATTCCCAAGACTCCATTTCTTCATGACTGGATTCGCCCCACTTACCTCAAGAGGTTCCCAACAATACAGA 1000
GCCCTCACCGTCCCAGAGCTCACCCAACAAATGTTCGATGCCAAGAACATGATGTGCGCATCAGACCCAAGACACGGTAGATATCTTACCGCCTCAGCTC 1100
TCTTCAGAGGTAGAATGTCAACCAAAGAAGTCGATGAACAAATGCTTAACGTTCAAAACAAGAACTCATCTTACTTCGTCGAGTGGATCCCCAACAACAT 1200
CAAGTCATCAGTCTGCGATATCCCACCAAAGGGACTCAAGATGGCCGTCACCTTCCTCGGTAACTCAACTGCCATCCAAGAGATGTTCAAGAGAGTTGGT 1300
GAACAATTCACTGCTATGTTCAGAAGAAAGGCCTTCCTCCATTGGTACACTGGTGAAGGTATGGACGAGATGGAATTCACTGAAGCTGAGTCAAACATGA 1400
ACGATCTCGTTTCCGAGTATCAACAATATCAAGATGCCACCGCCGAAGACGAGGAAGAGATGGACGAGGAGCAAATGGAATGAGACATTAGCTGAACAGC 1500
ACACAGCAACAACAAACCATATGATTAACTTAAGATTTTCTCTAAGATCTAAACAATAATCTATTCTTCAAACAATATAATATAACTTATTAAACTAAT 1600
AATGTTTTAAATTCATGTATAGGCAGATATAAAGAATTGAAAATGGCAGGAAAGATCAATAAACTAGTTTAAAGCAAGAGACTTTGCTTTCACTAAAGAT 1700
ATTGTGATATGTGTCGACATTATCAAGAAGAATATCCAATAACTTTAATAAGAAATAAAAATCAAATAAAAATTGATAAATATAGATTTATTTAGAAAAT 1800
TTAGATGAAAAATCTAATTCATTTATGGGGTTTTGGGGTTTTGGGG 1845
```

β-2 Tubulin:

```
CCCCAAAACCCCAAAACCCCATGTGACTCAGATTGTAAAATATTTCAAGTAAATAAGTAATATATATCTAAAGTGATCAGTAAAGTAAAATTCAATCCTG  100
TCCATCCGTTTGAATTTAATTGTTATAAATATGCGCCCTCTCTAACTAATATATAATTCAAATAATTTTCAAAACAAAACTCAAGTCACAATGAGAGAAA  200
TCGTTCACATTCAAGGTGGTCAATGCGGTAACCAAATCGGAGCCAAGTTCTGGGAAGTCATCTCAGACGAGCACGGAATCGACCCAACTGGTACCTACCA  300
TGGTGACTCAGATCTCCAACTTGAGAGAATCAACGTCTACTACAACGAAGCCACTGGTGGAAGATACGTACCAAGAGCAGTCCTTATGGACTTGGAACCA  400
```

GGTACCATGGATTCAGTTAGAGCTGGTCCATTCGGTCAACTCTTCAGACCAGACAACTTCGTCTTCGGTCAATCAGGTGCTGGTAACAACTGGGCCAAGG 500
GTCATTACACTGAGGGTGCCGAACTCATCGATTCAGTTCTCGACGTTGTTAGAAAGGAAGCTGAAGGTTGCGATTGCCTCCAAGGTTTCCAAATCACCCA 600
CTCACTCGGTGGTGGTACCGGTTCAGGTATGGGAACCCTCCTCATCTCCAAGGTTAGAGAAGAGTACCCAGACAGAATCATGGCCACTTTCTCAGTCGTC 700
CCATCACCAAAGGTCTCAGATACCGTCGTTGAGCCATACAACGCCACTCTCTCAGTCCATTAACTCGTCGAAAACGCCGATGAAGTTATGTGTATTGATA 800
ACGAGGCTCTCTATGATATCTGCTTCAGAACCCTCAAGCTCACCACCCCAACCTACGGAGATCTTAACCACTTGGTCTCAGCTGGTATTTCAGGTGTTAC 900
TTGCTGCCTCAGATTCCCAGGTCAACTCAACTCTGATCTCAGAAAGCTTGCAGTCAACTTGATTCCATTCCCAAGACTCCATTTCTTCATGACTGGTTTC 1000
GCCCCACTTACCTCAAGAGGTTCTCAACAATACAGAGCTCTTACCGTCCCAGAGCTTACCCAACAAATGTTCGATGCCAAGAACATGATGTGCGCTTCAG 1100
ATCCAAGACACGGAAGATATCTTACCGCCTCCGCTCTCTTCAGAGGTAGAATGTCAACCAAAGAAGTCGACGAGCAAATGCTTAACGTACAAAACAAGAA 1200
CTCATCTTATTTCGTTGAGTGGATCCCCAACAACATCAAGTCATCAGTCTGTGATATCCCACCAAAGGGACTCAAGATGGCCGTCACCTTCCTCGGTAAC 1300
TCAACTGCCATCCAAGAGATGTTCAAGAGAGTTGGTGAACAATTCACTGCTATGTTCAGAAGAAAGGCCTTCCTCCATTGGTACACTGGTGAGGGTATGG 1400
ACGAGATGGAATTCACTGAAGCTGAATCCAACATGAACGATCTCGTTTCTGAGTATCAACAATATCAAGATGCCACCGCTGAGGATGAAGAAGAGATGGA 1500
CGAGGAACAAATGGAATGATCTGCTTGATTTTTACAAAATATAAGATAATTTAAGTAACAATTCCACCACCTCTAAACTTTCTTTATATATAAAAACTG 1600
TCTACATCTTATATATCCACATATTCCAGAAATGTTATTTGTCTTTTAATTTCGACAAAATCTGCGTATAAGTTTCTATCTCTCCATCAATTATATCCTA 1700
ATTCAGCCTATATTTCTATATCTTAGCAAGTTCTCATCGATATATAGTATTTTAATTCGCTTTCACACTTTATTAAAATCATGATTTTCATCTTTTATCT 1800
CATGGGGTTTTGGGGTTTTGGGGTTTTGGGG 1831

Abb. 7: Sequenz der beiden β-Tubulingene. Die Start- und Stopcodons ATG und TGA sind unterstrichen.

Die klonierten β-Tubulingene sind 1846 bp (β1) und 1831 bp (β2) lang. Beide weisen ein offenes Leseraster von 1329 b (incl. TGA Stop-Codon) auf und codieren ein Protein mit 442 Aminosäuren. Das β2-Gen besitzt vor dem eigentlichen ATG-Initiationscodon zwei weitere ATGs. Das erste wird direkt von einem TGA-Stopcodon gefolgt. Das zweite liegt im richtigen Leseraster, doch zeigten vergleichende Untersuchungen des Codon-Gebrauches und Sequenzvergleiche der nichtcodierenden Regionen (3.4.1.1; 3.4.2.1), daß der Bereich zwischen dem 2. und 3. ATG eindeutig dem 5'-nichtcodierenden Bereich zuzuordnen ist. Dies zeigt sich auch in der Nukleotidzusammensetzung der betreffenden Bereiche: Die codierenden Regionen besitzen einen G+C Gehalt von 48,6% (β1) und 47,6% (β2). Davon weichen die nichtcodierenden Bereiche mit 23,8% und 23,3% (5'- und 3'-nichtcodierend des β1) und mit 25,3% und 25,7% (5'- und 3'-nichtcodierend des β2) drastisch ab. Beide Gene weisen nach dem Stopcodon TGA ein weiteres TGA im selben Leseraster auf. Zwischen dem Stopcodon und dem zusätzlichen TGA liegen 6 (β1) bzw. 9 (β2) Nukleotide. An den Enden

finden sich die terminalen Repeats, sie sind im β1-Gen 28 und 20 bp lang (5' bzw. 3') und im β2- Gen 20 und 28 bp. Die nichtcodierenden Sequenzen sind 126 und 343 bp (5' bzw 3' im β1) und 170 und 284 bp (5' bzw 3' im β2) lang. Für die Gene ergibt sich also folgendes schematisches Bild:

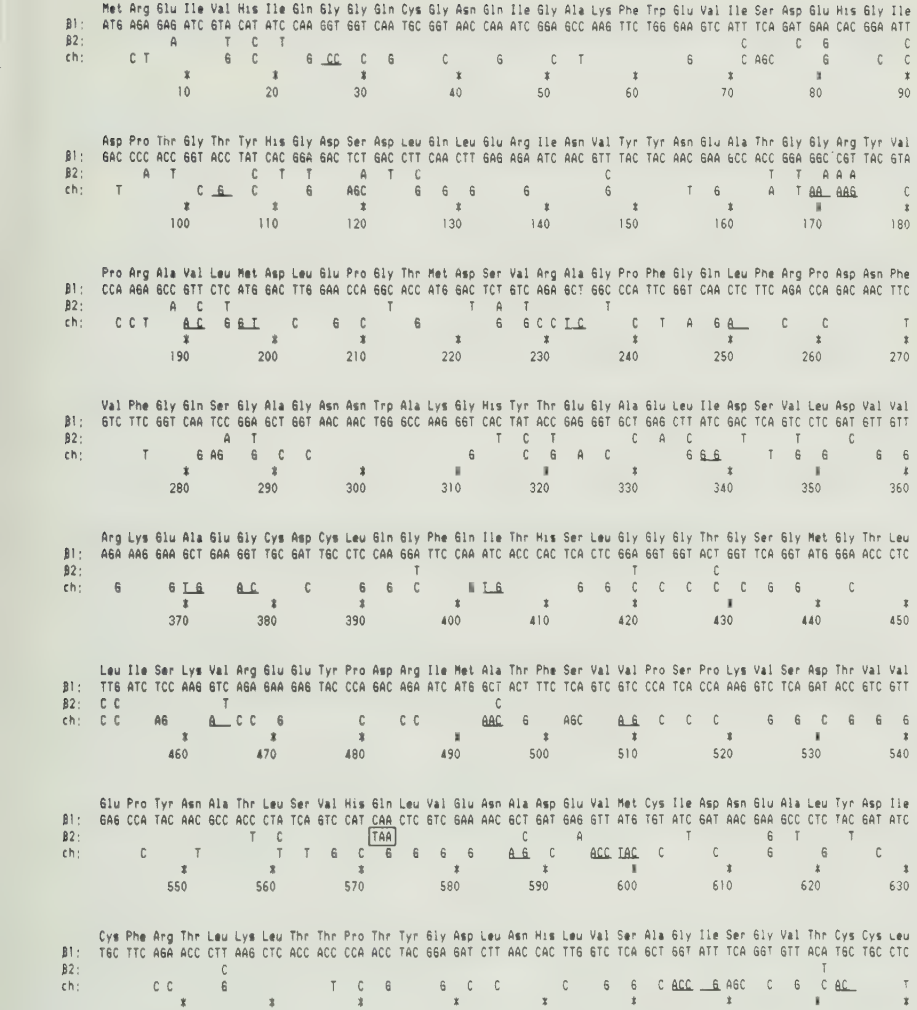
	C4A4	Nichtcod.	Codierend	Nichtcod.	G4T4
β1:	5'				
bp:	28	126	1329	343	20
G+C:		23,8%	48,6%	23,3%	
β2:	5'				
bp:	20	170	1329	284	28
G+C:		25,3%	47,6%	25,7%	

3.3.1 Der codierende Bereich der β-Tubulingene

3.3.1.1 Nukleotidsequenz und Codongebrauch

Die Sequenzen der codierenden Regionen und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz der β-Tubuline sind im Vergleich mit den Daten vom Hühnchen (Valenzuela et al., 1980) in Abb. 8 gezeigt. Die Nukleotidsequenz-Homologie der codierenden Bereiche der beiden β-Tubulingene von *Stylonychia* liegt bei 93,2%. Von den 90 Nukleotidaustauschen im codierenden Bereich finden 79 lediglich in der dritten Position eines Codons statt. Bei 5 Codons ist neben dem dritten auch das erste Nukleotid ausgetauscht. An Position 571 besitzt das β2-Gen das ciliatenspezifische Codon TAA, das für Glutamin codiert (Helftenbein, 1985; Caron und Meyer, 1985; Horowitz und Gorovsky, 1985; Preer et al. ,1985). An derselben Position besitzt β1 ein CAA-Codon. Keiner der Nukleotidaustausche führt zu einer Veränderung einer Aminosäure. Die beiden Gene codieren ein identisches Protein.

Die Nukleotidsequenz-Homologie zum β-Tubulingen des Hühnchens ist mit 72% (β1) und 71,5% (β2) sehr hoch. Die beobachteten 375 (β1) und 381 (β2) Nukleotidaustausche führen lediglich zu 53 Aminosäureaustauschen gegenüber dem β-Tubulin des Hühnchens (=88,1% Homologie). 273 (β1) und 283 (β2) Nukleotidaustausche beruhen auf einem unterschiedlichen Gebrauch der Codons bei *S. lemnae* und dem Hühnchen (Abb. 8; Tab. 1).


Met Arg Glu Ile Val His Ile Gln Gly Gly Gln Cys Gly Asn Gln Ile Gly Ala Lys Phe Trp Glu Val Ile Ser Asp Glu His Gly Ile
B1: ATG AGA GAG ATC GTA CAT ATC CAA GGT GGT CAA TGC GGT AAC CAA ATC GGA GCC AAG TTC TGG GAA GTC ATT TCA GAT GAA CAC GGA ATT
B2:
ch:
10 20 30 40 50 60 70 80 90
Asp Pro Thr Gly Thr Tyr His Gly Asp Ser Asp Leu Gln Leu Glu Arg Ile Asn Val Tyr Tyr Asn Glu Ala Thr Gly Gly Arg Tyr Val
B1: GAC CCC ACC GGT ACC TAT CAC GGA GAC TCT GAC CTT CAA CTT GAG AGA ATC AAC GTT TAC TAC AAC GAA GCC ACC GGA GGC CGT TAC GTA
B2:
ch:
100 110 120 130 140 150 160 170 180
Pro Arg Ala Val Leu Met Asp Leu Glu Pro Gly Thr Met Asp Ser Val Arg Ala Gly Pro Phe Gly Gln Leu Phe Arg Pro Asp Asn Phe
B1: CCA AGA GCC GTT CTC ATG GAC TTG GAA CCA GGC ACC ATG GAC TCT GTC AGA GCT GGC CCA TTC GGT CAA CTC TTC AGA CCA GAC AAC TTC
B2:
ch:
190 200 210 220 230 240 250 260 270
Val Phe Gly Gln Ser Gly Ala Gly Asn Asn Trp Ala Lys Gly His Tyr Thr Glu Gly Ala Glu Leu Ile Asp Ser Val Leu Asp Val Val
B1: GTC TTC GGT CAA TCC GGA GCT GGT AAC AAC TGG GCC AAG GGT CAC TAT ACC GAG GGT GCT GAG CTT ATC GAC TCA GTC CTC GAT GTT GTT
B2:
ch:
280 290 300 310 320 330 340 350 360
Arg Lys Glu Ala Glu Gly Cys Asp Cys Leu Gln Gly Phe Gln Ile Thr His Ser Leu Gly Gly Gly Thr Gly Ser Gly Met Gly Thr Leu
B1: AGA AAG GAA GCT GAA GGT TGC GAT TGC CTC CAA GGA TTC CAA ATC ACC CAC TCA CTC GGA GGT GGT ACT GGT TCA GGT ATG GGA ACC CTC
B2:
ch:
370 380 390 400 410 420 430 440 450
Leu Ile Ser Lys Val Arg Glu Glu Tyr Pro Asp Arg Ile Met Ala Thr Phe Ser Val Val Pro Ser Pro Lys Val Ser Asp Thr Val Val
B1: TTG ATC TCC AAG GTC AGA GAA GAG TAC CCA GAC AGA ATC ATG GCT ACT TTC TCA GTC GTC CCA TCA CCA AAG GTC TCA GAT ACC GTC GTT
B2:
ch:
460 470 480 490 500 510 520 530 540
Glu Pro Tyr Asn Ala Thr Leu Ser Val His Gln Leu Val Glu Asn Ala Asp Glu Val Met Cys Ile Asp Asn Glu Ala Leu Tyr Asp Ile
B1: GAG CCA TAC AAC GCC ACC CTA TCA GTC CAT CAA CTC GTC GAA AAC GCT GAT GAG GTT ATG TGT ATC GAT AAC GAA GCC CTC TAC GAT ATC
B2:
ch:
550 560 570 580 590 600 610 620 630
Cys Phe Arg Thr Leu Lys Leu Thr Thr Pro Thr Tyr Gly Asp Leu Asn His Leu Val Ser Ala Gly Ile Ser Gly Val Thr Cys Cys Leu
B1: TGC TTC AGA ACC CTT AAG CTC ACC ACC CCA ACC TAC GGA GAT CTT AAC CAC TTG GTC TCA GCT GGT ATT TCA GGT GTT ACA TGC TGC CTC
B2:
ch:
640 650 660 670 680 690 700 710 720

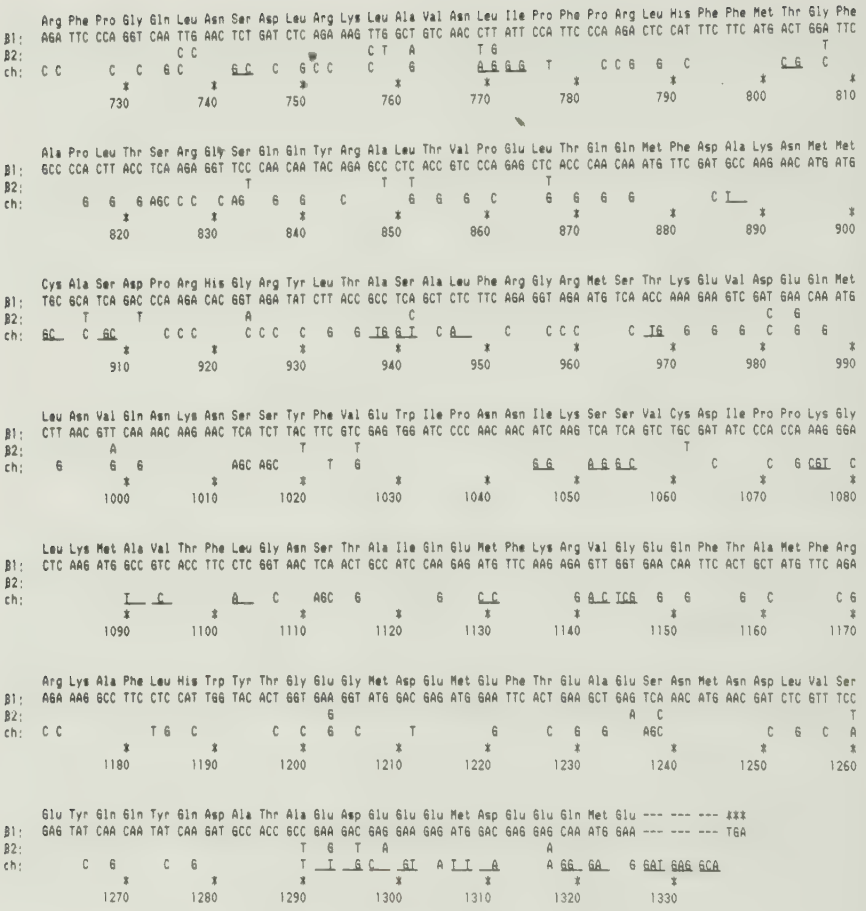


Abb. 3. Nukleotidsequenz der codierenden Regionen der β-Tubulingene von *S. lemnae*. Die Nukleotidsequenz von β1 ist komplett dargestellt, beim β2 und beim β-Tubulingen des Hühnchens (ch, Valenzuela et al. 1981) sind nur die von der β1-Sequenz abweichenden Nukleotide gezeigt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des *β-Tubulins von S. lemnae* ist in der oberen Linie angegeben. Nukleotidaustausche, die zu einem Aminosäureaustausch gegenüber dem β-Tubulin des Hühnchens führen, sind unterstrichen. Das für Ciliaten spezifische Codon TAA, das für Glutamin codiert, ist eingerahmt (β1, Pos. 571).

	β1	β2	ch	nc	sc		β1	β2	ch	nc	sc		β1	β2	ch	nc	sc		β1	β2	ch	nc	sc
TTT Phe	0	0	22	0	32	TCT Ser	15	15	7	19	54	TAT Tyr	33	33	0	7	53	T6T Cys	11	22	0	0	80
TTC Phe	100	100	78	100	68	TCC Ser	15	11	17	78	16	TAC Tyr	66	66	100	93	47	T6C Cys	89	78	100	100	20
TTA Leu	0	0	0	0	12	TCA Ser	70	74	4	0	8	TAA(Gln)	0	5	0	100	100	T6A ---	100	100	100	0	0
TTG Leu	15	9	6	6	55	TCG Ser	0	0	24	0	8	TAG ---	0	0	0	0	0	T6G Trp	100	100	100	100	100
CTT Leu	26	26	6	18	21	CCT Pro	0	0	5	11	32	CAT His	40	50	0	40	45	C6T Arg	5	0	14	44	17
CTC Leu	56	64	19	73	0	CCC Pro	11	5	80	89	16	CAC His	60	50	100	60	55	C6C Arg	0	0	50	48	6
CTA Leu	3	0	0	0	6	CCA Pro	89	94	0	0	47	CAA Gln	100	95	5	14	82	C6A Arg	0	0	14	0	6
CTG Leu	0	0	69	3	6	CCG Pro	0	0	15	0	5	CAG Gln	0	0	95	86	18	C6G Arg	0	0	9	0	0
ATT Ile	22	22	0	31	45	ACT Thr	25	39	3	26	36	AAT Asn	0	0	9	4	44	A6T Ser	0	0	0	0	5
ATC Ile	78	78	100	69	55	ACC Thr	71	61	50	74	20	AAC Asn	100	100	91	96	56	A6C Ser	0	0	48	3	8
ATA Ile	0	0	0	0	0	ACA Thr	4	0	3	0	28	AAA Lys	7	7	0	0	31	A6A Arg	95	100	0	0	67
ATG Met	100	100	100	100	100	ACG Thr	0	0	43	0	16	AAG Lys	93	93	100	100	69	A6G Arg	0	0	14	8	6
GTT Val	33	40	4	28	27	GCT Ala	41	41	15	43	50	GAT Asp	54	62	27	43	59	G6T Gly	63	82	9	55	64
GTC Val	60	53	24	64	33	GCC Ala	56	52	74	54	25	GAC Asp	46	38	73	57	41	G6C Gly	8	0	71	42	18
GTA Val	7	7	0	0	12	GCA Ala	4	7	4	0	22	GAA Glu	51	54	14	3	69	G6A Gly	29	18	6	0	6
GTG Val	0	0	72	8	27	GCG Ala	0	0	7	3	3	GAG Glu	49	46	86	97	31	G6G Gly	0	0	14	3	12

Tabelle 1: Codongebrauch in den β-Tubulingenen von *S. lemnae* (β1, β2), des Hühnchens (ch; Valenzuela et al., 1981), *Neurospora crassa* (nc; Orbach et al., 1986) und der Hefe (sc; Neff et al., 1983). Die Werte geben den Prozentsatz an, in dem die Codons benutzt werden, um die korrespondierende Aminosäure zu codieren. Stopcodons sind bei *S. lemnae*, dem Hühnchen und *Neurospora crassa* TAG und bei der Hefe TAA.

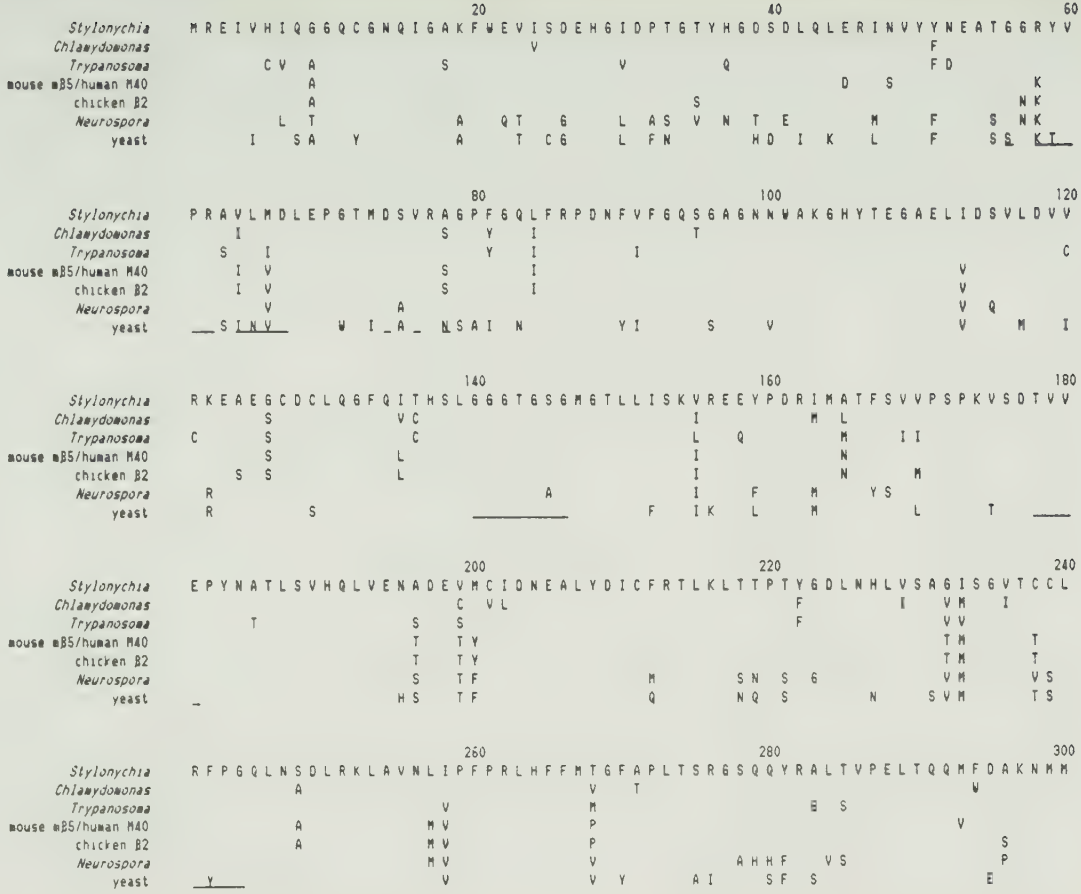
Von den 64 möglichen Codons werden beim Hühnchen nur 14 nicht benutzt, während bei *S. lemnae* 21 im β1 und sogar 24 Codons im β2 nicht benutzt werden. Es wird vor allem auf Codons, die G an dritter Stelle besitzen, verzichtet. Von den 13 möglichen Sinncodons dieser Art werden lediglich 3 (TTG, GAG und AAG für Leu, Glu und Lys) eingesetzt. Auch innerhalb einzelner Codonfamilien werden einzelne Codons bevorzugt oder sogar ausschließlich benutzt (z.B. Arg, Pro, Asn). Beim Hühnchen werden vorwiegend die Codons verwendet, die die größte Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Anticodon ermöglichen und nicht G an dritter Position besitzen (Ausnahmen nur Leu [CTG] und Val [GTG]). Bei Stylonychia gilt dasselbe Prinzip, allerdings wird viel rigoroser

auf die Codons, die mit G enden, verzichtet und auch Codons, die weniger Wasserstoffbrückenbindungen ermöglichen, werden häufiger verwendet (Ser, TCA; Pro, CCA; Asp, GAT; Arg, AGA; Gly, GGT). In Tabelle 1 sind zum weiteren Vergleich des Codongebrauchs die Daten der β-Tubulingene aus der Hefe und aus *Neurospora crassa* angegeben (Neff et al., 1983; Orbach et al., 1986). Von den 61 Sinncodons werden im β-Tubulingen der Hefe nur drei nichtbenutzt und die Tendenz zur Benutzung einzelner Codons innerhalb der Codonfamilien ist nicht sehr groß.

3.3.1.2 Die vorhergesagte Aminosäuresequenz und Homologievergleiche.

Die *Stylonychia lemnae* β-Tubulingene codieren ein Polypeptid mit 442 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 49.427 (Abb. 8). Die Aminosäuresequenz zeigt starke Homologien zu den Tubulingenen anderer Organismen, z.B. Chlamydomonas 90,8%; Trypanosoma 89,4%; Maus/Mensch 89,6%; Hühnchen 88,1%; Neurospora crassa 80,3%; Hefe 71,1%. Homologe Bereiche erstrecken sich über das gesamte Protein und sind durch kurze variable Abschnitte getrennt (Abb. 9). Sehr stark konserviert ist die Region vor dem Carboxy-Ende des Proteins (AS 383-428), während die terminalen Aminosäuren sehr starke Variabilitat zeigen und Unterschiede auch in den Längen der Proteine bestehen (*S. lemnae* 442, Hefe 457 AS). Das Carboxy-Ende weist aber stets eine große Anzahl saurer Aminosäuren auf.

Die homologen Bereiche zu anderen Nukleotid-bindenden Proteinen (z.B. Elongationsfaktor Tu, p21, Glutathionreduktase, einige Oncogenprodukte; Mandelkow et al., 1985) bleiben auch im β-Tubulin von *S. lemnae* erhalten. Besonders die Phosphat- und Ribose bindenden Bereiche sind streng konservativ. Der Basenbindungsbereich am N-terminalen Ende weist einige Austausche auf, während der im Zentrum des Proteins wiederum streng konserviert ist (Abb. 9). Diese Bereiche sind auch zum α-Tubulin von *S. lemnae* homolog. Auch hier zeigt die N-terminale Basenbindungsstelle einige Varianz, wohingegen die Phosphat- und Ribose bindenden Bereiche exakte Homologie besitzen (Abb. 10). Die Gesamt-Homologie zwischen α- und β-Tubulin von *Stylonychia* liegt bei optimalem Anlegen der Proteine bei 42,8%, ein deutlicher Hinweis auf ein gemeinsames Vorläufer-Protein. Die Homologie zwischen α- und β-Tubulinen anderer Organismen liegt bei ca. 41% (Cowan, 1984).


20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
260
280
300
Stylonychia
Chlamydomonas
Trypanosoma
mouse mβ5/human M40
chicken β2
Neurospora
yeast

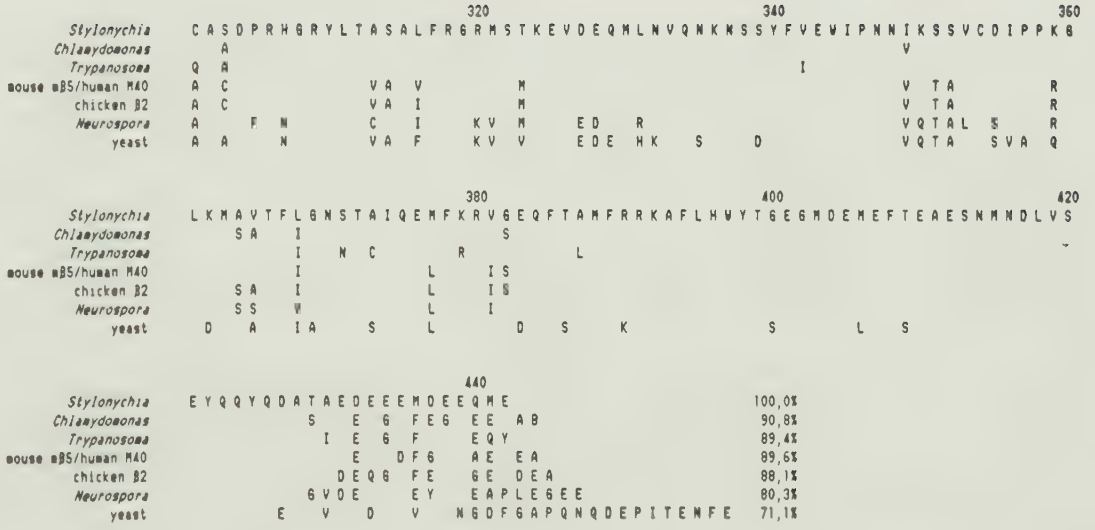


Abb. 9: Vergleich des *Stylonychia*-β-Tubulins mit β-Tubulinen anderer Organismen. Die abgeleitete Sequenz des *Stylonychia*-Tubulins ist in der oberen Linie komplett im Einzelbuchstaben-Code angegeben. Bei den anderen Tubulinen sind nur die von der *Stylonychia*-Sequenz abweichenden Aminosäuren gezeigt. Am Ende der Sequenzen ist die Homologie zum *Stylonychia*-β-Tubulin angegeben. Bei Maus, Mensch und Hühnchen wurden jeweils die Isotypen ausgewählt, die die größte Homologie zum *Stylonychia*-β-Tubulin zeigen. Die Sequenzdaten stammen von Youngblom et al., 1984 (*Chlamydomonas reinhardtii*), Kimmel et al., 1985 (*Trypanosoma brucei rhodesiense*), Wang et al., 1985 (Maus Isotyp M5β und Mensch Isotyp M40), Valenzuela et al., 1981 (Hühnchen Isotyp β2), Orbach et al., 1986 (*Neurospora crassa*) und Naff et al., 1988 (*Saccharomyces cerevisiae*). Die Regionen, die vermutlich bei der Bindung von GTP beteiligt sind, sind unterstrichen (Mandelkow et al., 1986).

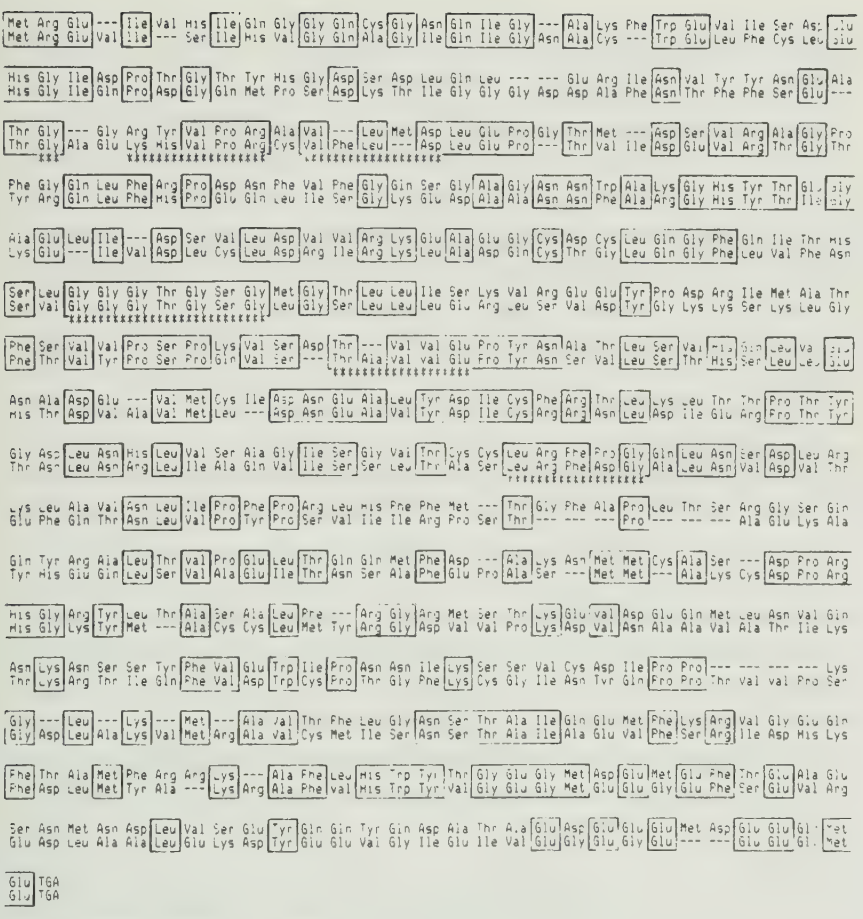


Abb. 10: Homologie zwischen dem α1- und dem β-Tubulin von *Stylonychia lemnae*. Homologe Aminosäuren sind eingerahmt. Homologien zu anderen nukleotidbindenden Proteinen sind durch *** gekennzeichnet (Mandelkow et al., 1986).

3.3.2 Die nichtcodierenden Bereiche der β-Tubulingene

3.3.2.1 Die Struktur der nichtcodierenden Regionen

Die nichtcodierenden Regionen der beiden β-Tubulingene sind in Länge und Nukleotidsequenz verschieden. Die 5'-nichtcodierenden Bereiche sind 126 (β1) und 170 bp (β2) lang, die 3'-nichtcodierenden Bereiche 343 (β1) und 284 bp (β2). Die nichtcodierenden Regionen werden am 5' Ende durch 28 (β1) und 20 (β2) bp lange C_4A_4-repeats terminiert. Umgekehrt besitzt β1 am 3' Ende nur 20 bp, β2 aber 28 bp lange G_4T_4-repeats (Abb. 11). Beide Gene zeigen in den nichtcodierenden Bereichen einen sehr geringen G+C-Gehalt von 23,8% und 23,3% (5'- und 3' β1) und 25,3% und 25,7% (5'- und 3' β2). Homologe Sequenzabschnitte wurden mit Hilfe des Homologieprogramms der Pustell-Software gesucht (Pustell und Kafatos, 1982). Sowohl die beiden 5'- als auch die 3'-nichtcodierenden Bereiche sind in der Nukleotidsequenz verschieden. Der einzige längere Homologieabschnitt der 5'-Regionen umfasst 18 bp von Pos. -2 bis -19 in β1 und Pos. -11 bis -28 in β2 (Abb. 11). Außerdem sind zwei identische Hepta- und ein Octanukleotid vorhanden. Diese sind allerdings sehr A+T-reich, sodaß in der A+T-reichen nichtcodierenden Region für diese kurzen Sequenzen keine signifikante Homologie vorliegt. Längere identische Sequenzabschnitte in den 3'-nichtcodierenden Regionen sind lediglich drei Octanukleotide, von denen zwei gänzlich unterschiedliche Positionen innerhalb des 3'-trailers einnehmen. Das einzige Oktanukleotid mit hohem G+C-Gehalt (GCTTTCAC, 50% G+C) liegt in vergleichbarer Position (Pos. +203 in β1, +240 in β2), sodaß diese Sequenz vielleicht eine spezifische Funktion hat.

Vergleiche der Basenzusammensetzung der nichtcodierenden Regionen zeigen mehr Ähnlichkeiten. Die Basenzusammensetzung der nichtcodierenden Regionen wurde mit dem Pustell Base Composition Programm errechnet. Die wenigen Guanine und Cytosine sind in den nichtcodierenden Regionen nicht statistisch verteilt. Das G+C-Profil der beiden 5' nichtcodierenden Bereichen zeigt einige Gemeinsamkeiten (Abb. 12). Vor dem Startcodon ATG liegen in beiden Genen ca. 40 bp lange Abschnitte mit extrem hohem A+T Anteil (89,4% in β1; 85,7% in β2). Direkt davor befindet sich jeweils ein hoher GC-Peak. Von hier an fällt der G+C-Gehalt bis zu den C_4A_4-Repeats am 5'-Ende stetig ab. In diesen Bereich sind einzelne kurze AT-reiche Abschnitte eingestreut. Ganz ähnliche Verhältnisse wurden bei den nichtcodierenden Regionen der Histongene von *Tetrahymena* gefunden (Horowitz et al., 1987). Die 3'-nichtcodierenden Regio-

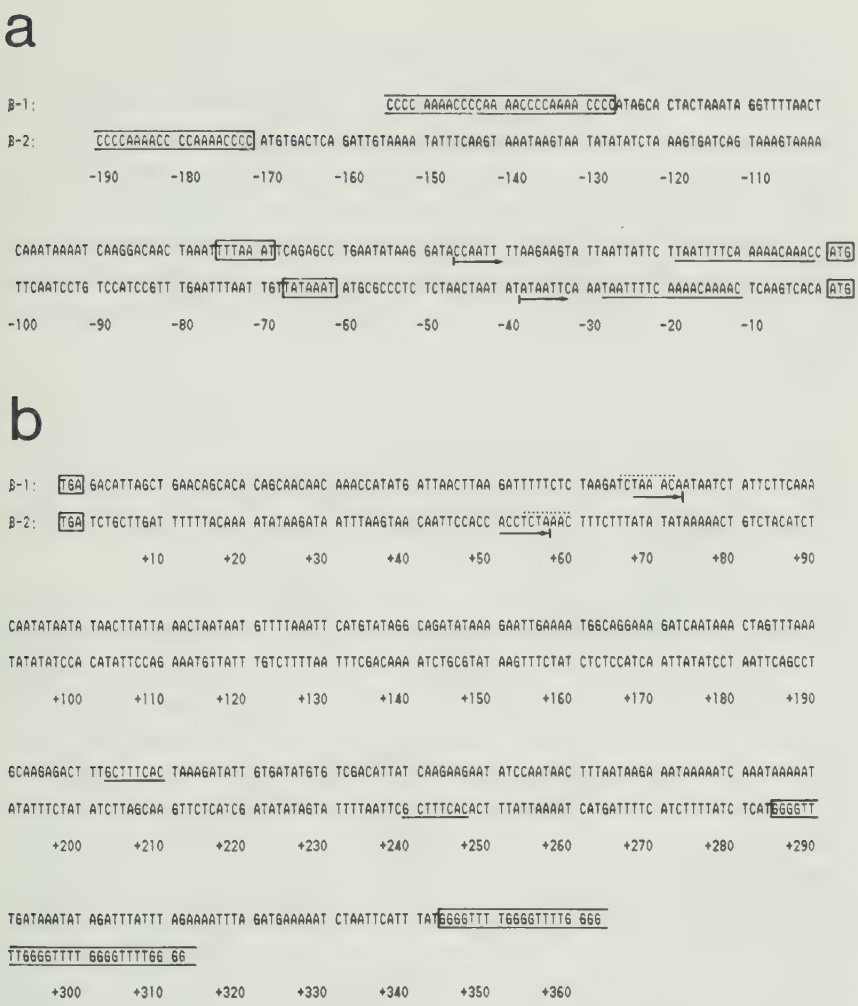


Abb. 11: Nichtcodierende Sequenzen der β-Tubulingene von *Stylonychia*.
(a) 5'- und (b) 3'- nichtcodierende Bereiche. Die Transkriptionsstart- und -endpunkte sind durch Pfeile gekennzeichnet, homologe Bereiche sind unterstrichen. Die vermutlichen 'TATA-Boxen' sind eingerahmt, ebenso die terminalen Repeats. Das Heptanukleotid TCTAAAC, das eventuell am 3'-Processing beteiligt ist, ist durch Punkte hervorgehoben. Die Hairpins der vermutlichen Replikationsorigins sind durch unterbrochene Linien hervorgehoben.

nen zeigen weniger Ähnlichkeiten. Kurz vor den terminalen G_4T_4 - Repeats liegt beim β1 ein ca. 60 bp langer A+T reicher Bereich (91,7% A+T), beim β2 ist die entsprechende Region nur 30 bp lang und besitzt einen A+T-Gehalt von 86,7%. Der Mittelteil der 3'-trailer besitzt zahlreiche GC-Peaks. Um Pos. +110 liegt im β1 wiederum eine AT-reicher Abschnitt, der 43 bp umfasst und aus 90,7% A+T besteht. Ähnliche, aber kürzere Abschnitte liegen beim β2 um Pos. +30 und +70 mit 90,6% bzw. 91,3% A+T. Die GC-Profile der beiden 3'-nichtcodierenden Regionen der β-Tubulingene unterscheiden sich stark von denen der beiden α-Tubulingene, die nahezu identisch sind (Helftenbein und Conzelmann, in Vorbereitung).

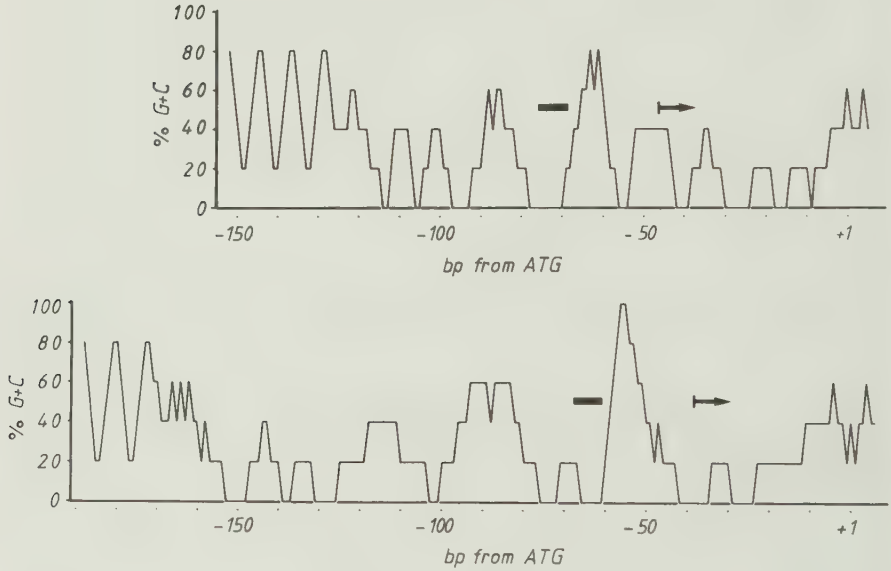


Abb. 12: GC-Profile der 5'-nichtcodierenden Regionen von β1 und β2. Der GC-Gehalt wurde für jedes Nukleotid mit dem Pustell-DNA-Analyseprogramm errechnet (Range = 2). Mit den erhaltenen Werten wurden die GC-Profile gezeichnet. Transkriptionsstart- und -endpunkte sind durch Pfeile gekennzeichnet, die Lokalisation der 'TATA-Boxen' ist durch schwarze Balken markiert.

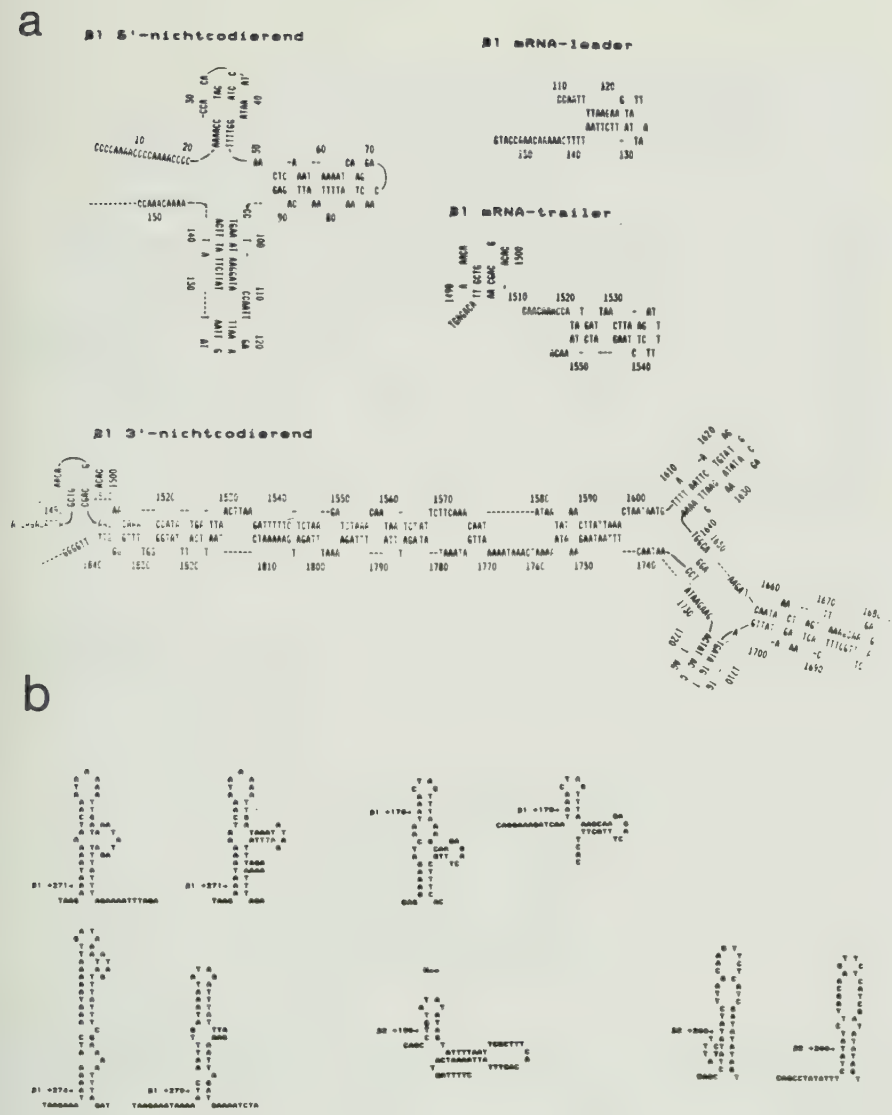


Abb. 13: Mit dem Pustell Programm erstellte Faltungen der nichtcodierenden Regionen, (a); Faltungen der gesamten nichtcodierenden Regionen der DNA und der mRNA von β1.(b) Beispiele für Hairpins im 3'-nichtcodierenden Bereich und deren verschiedene Faltungsmöglichkeiten, Start- und Stopcodons sind unterstrichen.

Sekundärstrukturen der nichtcodierenden Bereiche

Die gesamten nichtcodierenden Regionen könnten komplizierte Sekundärstrukturen einnehmen. Mit dem Pustell-tRNA-Folding-Programm wurde die gesamten 5'- und 3'-nichtcodierenden Regionen sowie die hypothetischen 5'-Leader und 3'-Trailer der mRNA gefaltet. In allen Fällen weisen die Moleküle extreme Rückfaltungsmöglichkeiten auf (Abb. 13a). Eine gemeinsame Sekundärstruktur für die nichtcodierenden Regionen der DNA oder mRNA ist jedoch nicht zu erkennen. Beispiele für einzelne Hairpins und deren unterschiedliche Ausbildungsmöglichkeiten sind in Abb. 13b gezeigt. Ob diese Strukturen funktionelle Bedeutung haben und im Chromatin des Makronukleus durch Proteine stabilisiert werden und so als regulative Signale fungieren könnten, oder lediglich zufällig aufgrund des hohen A+T-Anteils der Moleküle zustande kommen, bleibt zu untersuchen.

3'-Telomer-Bereiche

Die Sequenzhomologie ist auch im Bereich der 3'- terminalen Repeals sehr gering. Durch Verschieben lassen sich nur kurze identische Sequenzen zuordnen:

```
β1     -AATTTAGATGAAAAATC-T-AA--TTCAT---TTAT-----GGGGTTTTGGGG
β2     --ATT-------AAAATCATG-ATTTTCATCTTTTATCTCATGGGGTTTTGGGG

β1  ATTTA-G----ATGAA------------AAATCTAATTCATTTATGGGGTTTTGGGG
β2  A-TTAA-AATCATGA-TTTTCATCTTTT--ATCT----CAT----GGGGTTTTGGGG
```

Beim Vergleich mit den 3'-Enden der beiden α-Tubulingene lassen sich ebenfalls nur geringe Ähnlichkeiten feststellen:

```
β2 ----ATTA-A----AATCATG------------ATTTTCATCTTT--TATCTCA--T--------GGGGTTTTGGGG
α1 CCCCATT--A-TTTAATC--G------------ATT--C--------TATCTCAAA---------GGGGTTTTGGGG
α2 --CCA--ACATTTT---C--G-TGGA-TTCTTAATT--C------AA-ATCT----TT-------GGGGTTTTGGGG
β1 ----A--A-A-TTTA-----GATG-AA------------------AA-ATCT--AATTCATTTATGGGGTTTTGGGG
```

```
β1    ----A--A-ATTT-A----GATGAAAAA-TCT----AA--TTCAT----TTAT--------GGGGTTTTGGGG
β2    ---------ATT-----------AAAA-TC--ATG-ATTTTCAT-CTTTTATCTCA---TGGGGTTTTGGGG
α1    CCCCATT--ATTT-------------AA-TC----G-A--TTC-------TATCTCAAA--GGGGTTTTGGGG
α2    --CCA--ACATTTT-CGT-G--G----ATTCTT---AA--TTCA-A-----ATCT----TTGGGGTTTTGGGG
```

Die größten Ähnlichkeiten bestehen zwischen den Enden von β2 und α1 mit einem identischen Heptanukleotid, das 1 bzw. 2 Nukleotide vor den terminalen Repeats liegt. β1 und α2 besitzen ein gemeinsames Hexanukleotid 11 bzw. 2 Nukleotide vor den G_4T_4-Repeats.
Kurz vor dem 3'-Ende des β1 liegen zwei direkte Repeats von 10 und 7 bp, die durch 1 bzw 2 Nukleotide voneinander getrennt sind. Am 3'-Ende von β2 liegen kürzere Repeats von 6 und 5 bp (Abb. 11). Auch bei den α-Tubulingenen wurden kurz vor den G_4T_4-Blocks direkte Repeats gefunden. Ob ihnen eine Bedeutung zukommt, ist nicht bekannt.

3.3.2.2 Transkription der β-Tubulingene

Beide β-Tubulingene von *Stylonychia lemnae* werden transkribiert. Durch S_1-mapping konnten die genauen Transkriptionsstart- und -stoppunkte innerhalb der nichtcodierenden Regionen lokalisiert werden (Conzelmann und Helftenbein, 1987). Die Transkription beginnt im β1-Gen 46 bp und im β2-Gen 38 bp vor dem ATG-Codon (Pos. -46, β1; Pos. -38, β2). Die mRNA endet bei Pos. +73 bzw. Pos. +57 der 3'-nichtcodierenden Region (Abb. 14).

3.3.2.3 Regulative Sequenzen in den nichtcodierenden Bereichen

Promotorsequenzen im 5'-leader

Sequenzen, die dem 'TATA-box' Consensus $TATA^A/_TA^A/_T$ entsprechen und als eukaryontische Promotorbestandteile fungieren (Baker et al, 1979; Bucher & Trifonov, 1986), sind in der 5'-nichtcodierenden Region von β2, nicht aber in der von β1 zu finden (Abb. 11). Eine der drei Sequenzen liegt 22 bp oberhalb des Transkriptionsstartpunktes (Pos. -67 bis -61) und könnte so als echte 'TATA-box' fungieren. Die anderen liegen 85 bp oberhalb, bzw. genau auf dem Transkriptionsstartpunkt und sind deshalb wohl nicht als funktionell anzusehen. Im β1-Gen liegt 22 bp oberhalb des Transkriptionsstartpunktes eine der 'TATA-box' des β2-Gens sehr ähnliche Sequenz, bei der lediglich ein

A gegen ein T ausgetauscht ist (Abb. 11). An diese Sequenz, wie auch an die 'TATA-box' von β2 schließt sich ein kurzer, für die nichtcodierenden Regionen der Gene extrem G+C-reicher Abschnitt an (66% bzw. 80% G+C; Abb. 11, vgl. Abb. 12). Auch oberhalb sind, wenn auch in etwas unterschiedlicher Entfernung (β1 5, β2 15 bp) kurze G+C-reiche Abschnitte zu finden. Die Ähnlichkeit zu eukaryontischen Promotoren ('TATA-boxen' mit exakt gleichem Abstand zum Transkriptionsstartpunkt und die sie flankierenden G+C-reichen Abschnitte) deutet darauf hin, daß diese Strukturen in *S. lemnae* ebenfalls Promotor-Funktionen ausüben können. 'CAAT-box'-ähnliche Sequenzen und Sequenzen, die der 'capping-site' anderer Eukaryonten ähnlich sind, sind in keinem der beiden β-Tubulingene zu finden.

Transkriptionstermination oder 3'-Processing

Die m-RNA der β-Tubulingene endet 73 b (β1) und 57 b (β2) hinter dem TGA-Stopcodon (Abb.11). Die in anderen Eukaryonten als Polyadenylierungssignal fungierende hochkonservierte Sequenz AATAAA (Manley et al., 1985; Proudfoot & Brownlee 1976; Wickens & Stephenson 1984) ist nur in der 3'-nichtcodierenden Region von β1, nicht aber in der von β2 zu finden. Ihre Position im β1-Gen (+175, +271, +281) weit unterhalb des m-RNA-Endes (pos. +73), macht eine Beteiligung an einem Polyadenylierungsvorgang in *S. lemnae* unwahrscheinlich (Abb. 11). Sequenzen, die bei anderen Eukaryonten an der Termination der Polymerase II-Transkription oder am 3'-RNA-Processing beteiligt zu sein scheinen (Birnstiel et al., 1985; Berget, 1984; Conway & Wickens, 1985; Gil & Proudfoot, 1984; Grass et al., 1987; Mc Lauchlan et al., 1985), wurden weder in den β- noch in den α-Tubulingenen gefunden. Die mRNA der β-Tubulingene endet in oder kurz nach einer gemeinsamen Sequenz TCTAAAC (Abb. 11). Diese Sequenz ist in den nichtcodierenden Regionen jeweils nur einmal vorhanden. Auch die weitere Region um diese Sequenz zeigt nach günstigem Anlegen der Sequenzen zwischen den beiden β-Tubulingenen Ähnlichkeiten (Abb. 14). Ein Bestandteil der Sequenz TCTAAAC, das Pentanukleotid TAAAC wurde auch unmittelbar bei den 3'-Enden der α-Tubulin-mRNA in den α-Tubulingenen von *S. lemnae* gefunden (Helftenbein & Müller, 1987; Helftenbein & Conzelmann, in Vorbereitung) und scheint bei der Termination der Transkription oder dem 3'-Processing der m-RNA eine Rolle zu spielen.

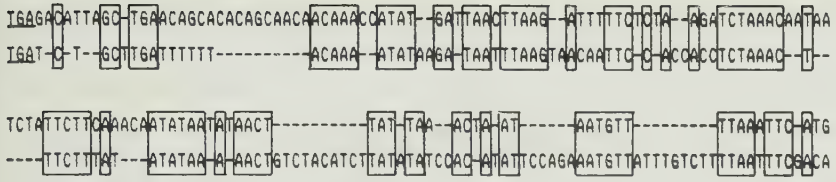
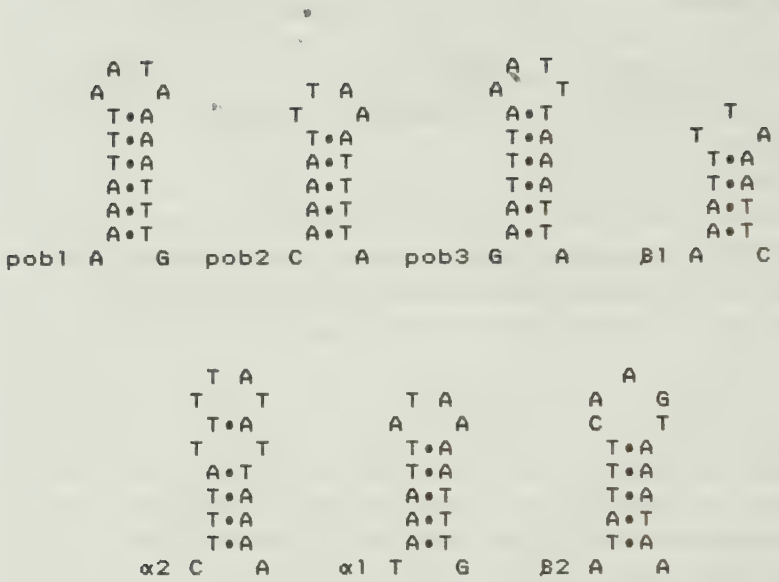


Abb. 14 : Umgebung des 3'-Endes der mRNAs der β-Tubulingene. Die Sequenzen wurden so verschoben, daß die größtmögliche Homologie im Bereich des Heptanukleotids TCTAAAC, das vielleicht beim 3' Processing der mRNA beteiligt ist, erreicht wird. Homologe Nukleotide sind eingerahmt. Die Stopcodons sind unterstrichen.

Replikationsorigins

In den 5'-nichtcodierenden Regionen von β1 und β2 liegen Sequenzen, die Ähnlichkeit mit autonom replizierenden Sequenzen (ARS) haben, und die Hairpinstrukturen durch A•T Paarungen ausbilden können. Diese Strukturen liegen in beiden Genen nahe bei den 5' terminalen C_4A_4-Repeats (48 bzw. 20 bp in β1 und β2 entfernt). In allen bisher untersuchten Makronukleusmolekülen wurden diese Hairpins, die mit Ausnahme des β2-Hairpins nur aus A und T bestehen, in ähnlichen Entfernungen zum 5'-Ende der Gene gefunden. Die 5'-nichtcodierende Region des überamplifizierten Makronukleusmoleküls pob A4 besitzt 3 solche Hairpins. Es liegen Ergebnisse vor, die zeigen, daß die Hairpins des pob A4 in heterologen Maus-L-Zellen Replikationsaktivität zeigen (Helftenbein et al., submitted). Direkt hinter den drei pob-Hairpins liegen nahezu identische Sequenzabschnitte, die auch Ähnlichkeiten zu den Sequenzen, die sich hinter den β- und auch α-Tubulin-Hairpins befinden, zeigen (Abb. 15).

a)



b)

```
α1   -50;      AAATTATAAAATTT---------gaatt--a--gtta
pob 1   ;    AAATTTAATAAAATTT---------gaatt--aaa-t--
pob 2   ;      AAAATTTAAATTTT-------atgaatt--aaa-tt-
pob 3   ;    AATTTAAATTTAAATT-aat---atgaattt-aa--tt-
β1   -48;         AATTTTAAATTcagagcc-tgaat---a---t-a
β2   -20;      TATTTCAAGTAAATA-ag-----t-aat---a---t-a
α2   -39;    TTTATTTTATATTAAA-acaa-----aat--caaa-t--
```

Abb. 15: Hypothetische Replikationsorigins verschiedener Makronukleusmoleküle. (a) Hairpinstrukturen in den 5'-nichtcodierenden Regionen der β-Tubulingene (β1, β2), α-Tubulingene (α1, α2) und die drei Hairpins des überamplifizierten pob (pob1, pob2, pob3) von *S. lemnae*. (b) Sequenzvergleich der Hairpinumgebung. Bei den α- und β-Tubulingenen ist die Entfernung der Hairpins (Großbuchstaben) vom den 5'-terminalen C_4A_4-Repeats angegeben.

3.4 Die Kopienzahl der β-Tubulingene im Makronukleus

Um die Anzahl der Moleküle, die im Makronukleus für β-Tubulin codieren, zu ermitteln, wurden quantitative Hybridisierunden durchgeführt. Eine Konzentrationsreihe nativer Makronukleus-DNA wurde auf Pall-Filter getüpfelt und mit radioaktiv markierten Restriktionsfragmenten aus den klonierten Genen hybridisiert. Als Standard diente ebenfalls eine Konzentrationsreihe mit denselben Fragmenten, die auch als Hybridisierprobe eingesetzt wurden. Die Proben enthielten beinahe die gesamte codierende Region der β-Tubulingene (β1: Kpn I / Eco R I, 1120 bp; β2: Ava II / Eco R I, 985 bp). Auf die nichtcodierenden Bereiche der Gene wurde verzichtet, um Kreuzhybridisierungen mit den nichtcodierenden Regionen anderer Makronukleusgene auszuschließen. Nach der Hybridisierung und Autoradiographie (Abb. 16a) wurden die Dots ausgeschnitten und die gebundene Radioaktivität durch Liquid Scintillation Counting bestimmt. Nach Anfertigung einer Eichkurve konnte die durch die Makronukleus-DNA gebundene Aktivität exakt mit den Werten der Standardreihe verglichen werden. So wurde festgestellt, daß durchschnittlich $^1/_{4000}$ der Makronukleus-DNA mit den jeweils eingesetzten Fragmenten hybridisierte. Mit einem DNA Gehalt von 780 pg/Makronukleus (Ammermann et al., 1974) und der Länge der eingesetzten Proben mit 1120 bzw. 985 bp ergibt sich eine Kopienzahl von 180.000 bzw. 205.000 nach folgender Rechnung:

$$\frac{c * ma * A}{MG_{(Fr)}} = n \text{ Moleküle/Makronukleus,}$$

wobei c = DNA-Gehalt des Makronukleus
A = Anzahl der Moleküle/Mol (Avogadro)
$MG_{(Fr)}$ = Molekulargewicht des Fragmentes
ma = Anteil der Makronukleus-DNA, der mit dem Fragment hybridisiert

z.B: $\frac{7{,}80*10^{-19}\,g * 0{,}286*10^{-3} * 6{,}03*10^{23}\ Molek*Mol}{7{,}4*10^{5}\ g*Mol}$

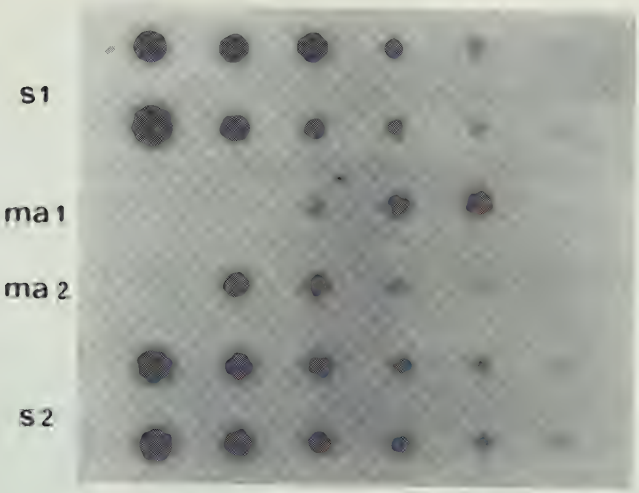
= 182.000 Moleküle/Makronukleus

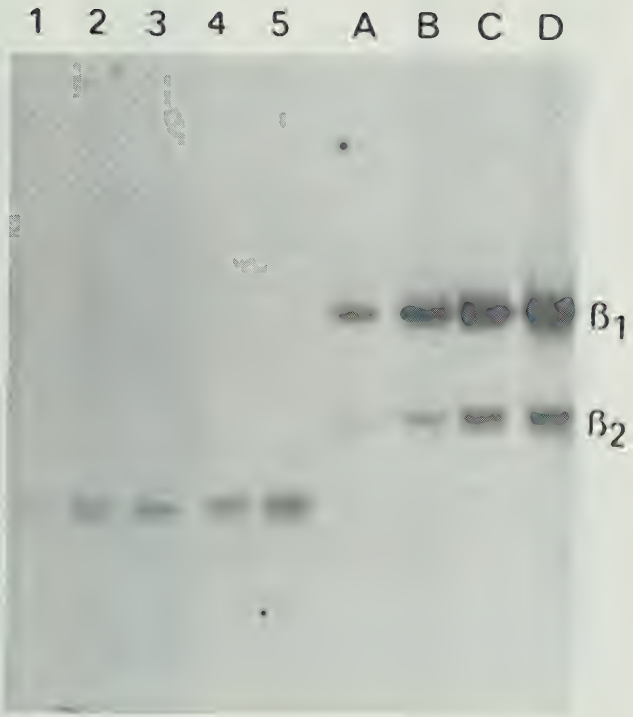
Um das Verhältnis β1/β2 im Makronukleus zu untersuchen, wurden ähnliche Experimente mit restriktionsverdauter und dann elektrophoretisch aufgetrennter Makronukleus-DNA durchgeführt. Die Restriktionsenzyme wurden so ausgewählt, daß die resultierenden Fragmente der beiden β-Tubulingene mög-

lichst groß, aber in den Agarosegelen deutlich voneinander getrennt werden konnten. So wurden in den einzelnen Experimenten Ava II, Nde I und Sal I-verdaute Makronukleus-DNA benutzt. Es wurden wie bei den Filterhybridisierungen Konzentrationsreihen der Makronukleus-DNA und der Probenfragmente auf 1,5% Agarosegele geladen, elektrophoretisch aufgetrennt und mit den β1- oder β2-spezifischen nicktranslatierten Proben hybridisiert. Nach der Autoradiographie (Abb. 16b) wurde die Radioaktivität der Banden durch Liquid Scintillation Counting bestimmt und wie oben beschrieben ausgewertet. Durch diese Versuche wurden die Ergebnisse der Filterhybridisierungen bestätigt und gezeigt, daß die Kopienzahl des β1 fünfmal größer ist (150.000 Kopien) als die des β2 (30.000 Kopien).

Bei den Gelhybridisierungen traten stets größere Schwankungen auf als bei den Filterhybridisierungen. Diese sind wohl auf die größeren Fehlermöglichkeiten bei den Gelhybridisierungen zurückzuführen (Geringfügige Unterschiede im Gel [Verdampfen beim Kochen und Gießen], Verlust von DNA beim Trocknen der Gele [unterschiedliche Temperatur, Vakuum, Zeit, Filterpapier] und beim Hybrisisieren [unterschiedliche Diffusion und Hybridisierungsbedingungen im Gel]). Deshalb müssen diese Versuche unter möglichst genau eingehaltenen Standardbedingungen durchgeführt werden. Desweiteren sind Restriktionsenzyme, die beide Gene schneiden, vorzuziehen, da diese eine Kontrolle auf Vollständigkeit des Verdaus bieten. Bei den angewandten Hybridisierungsbedingungen (63°C, Waschen bis 0,25*SSC bei 60°C; 2.7) traten aufgrund der hohen Sequenzhomologie der beiden Gene keine Unterschiede bei Verwendung von β1 oder β2 als Hybridisierproben auf.

Abb. 16: Kopienzahlbestimmung der β-Tubulingene im Makronukleus von *S. lemnae*. (a) Dot-Hybridisierung nativer Makronukleus-DNA (ma1, ma2; 4; 2; 1; 0,5 µg) mit radioaktiv markierten Proben aus den codierenden Regionen von β1 und β2. Als Standard diente eine Konzentrationsreihe der auch zur Hybridisierung verwendeten Fragmente (s1, s2; 3; 2; 1,5; 1; 0,5; 0,25 ng DNA). Die Dots wurden nach der Autoradiographie ausgeschnitten und die durch den hybridisierenden Makronukleus-DNA-Anteil gebundene Radioaktivität durch Liquid Scintillation Counting bestimmt. (b) Makronukleus-DNA wurde mit Ava II restringiert um, die β1- und β2-Tubulingene elektrophoretisch trennen zu können (A-D; 1,25; 2,5; 5 und 7,5 µg DNA). Eine Konzentrationsreihe eines β2 Eco R I / Ava II Fragments (985 bp) im selben Gel diente als Referenz (1-5; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75 und 1 ng DNA). Das Gel wurde getrocknet und mit dem radioaktiv markierten β2-Fragment hybridisiert. Die radioaktiven Banden wurden ausgeschnitten und die gebundene Aktivität durch Liquid Scintillation Counting bestimmt.


s1
ma1
ma2
s2


1 2 3 4 5 A B C D
ß1
ß2

3.5 RNA-Analysen

3.5.1 Gesamt-RNA von *Stylonychia lemnae*

Die größten Ausbeuten und die am besten erhaltene Gesamt-RNA wurde bei der Isolierung nach Glisin (1974; 2.3.1) erzielt. Bei diesem Verfahren, bei dem auch die DNS parallel isoliert werden kann, betrug die RNS-Ausbeute stets das dreifache der DNS Menge. Diese Ergebnisse stimmen mit den gemessenen Werten gut überein (780 pg DNS, Ammermann et al. 1974; 2800 pg RNS pro Zelle; Ammermann pers. comm.). Die RNA wurde nach der Isolierung stets elektrophoretisch in 4-6% Polyacrylamid-Harnstoffgelen getestet (2.5.2.2). *S. lemnae* besitzt eine große Menge an niedermolekularer RNA, die nicht aufgrund von Abbau während der Isolierung entsteht (Abb. 18). Im Verhältnis zur Gesamt-RNA ist der Anteil der ribosomalen RNAs geringer als bei anderen Eukaryonten (80-90%). Der exakte Gehalt wurde allerdings nicht bestimmt. Weiterhin sind nach der Auftrennung der RNA in PAH-Gelen zahlreiche distinkte Banden zu erkennen, gegenüber dem sonst eher diffusen Bild mit einzelnen heraustretenden Banden bei anderen Eukaryonten.

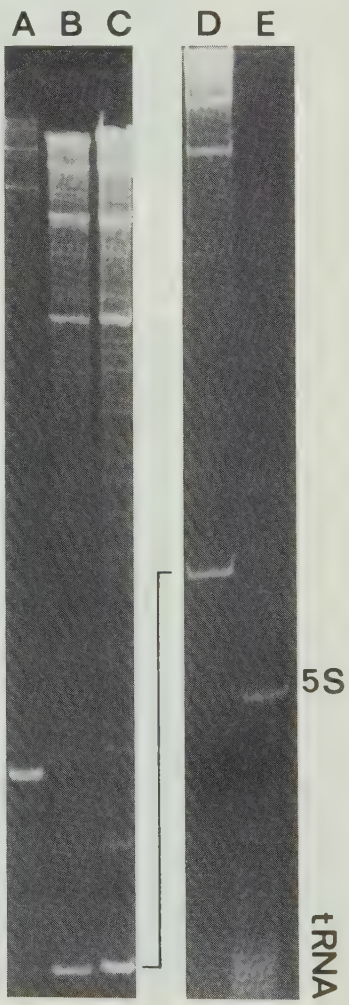


Abb. 18: Elektrophoretische Auftrennung der *S. lemnae* Gesamt-RNA (5% PAH-Gel). A; RNA-Marker; B,C; 2µg, 4µg Gesamt-RNA. Bei der RNA-Isolierung nach Glisin (1974) sind die kleine 5S ribosomale RNA und die tRNAs von *S. lemnae* nicht im Pellet, sondern in der DNA-Bande des CsCl-Gradienten zu finden (D; pelletierte RNA; E; RNA aus der 'DNA-Bande').

3.5.2 Polysomale RNA

Die Polysomale RNA (2.3.2) zeigt nach Auftrennung im PAH-Gel zahlreiche Banden, manche außergewöhnlich stark, die zum großen Teil aber eine geringe Größe besitzen (Abb. 19). In dem Größenbereich, in dem sich die meisten mRNA-Moleküle befinden sollten (>300 b), sind relativ wenige Banden zu erkennen. Die Ribosomale RNA ist, wie zu erwarten, in der polysomalen RNA-Fraktion nicht vertreten. Der größte Teil der 'polysomalen RNA' läßt sich am 5'-Ende ohne vorhergehende Dephosphorylierung oder Entfernung eines vorliegenden 5'-caps durch die Polynukleotidkinase mit ^{32}P-γ-ATP markieren (Abb. 19). Eukaryontische mRNA ist am 5'-Ende durch eine Cap-Struktur blockiert und dürfte kann auf diese Weise nicht markiert werden. Hybridisierungen zeigten, daß die vorliegende 'polysomale RNA' praktisch keine β-Tubulin mRNA enthielt (3.4.3). Diese Präparationen wurden deshalb nicht zur c-DNA-Synthese benutzt.

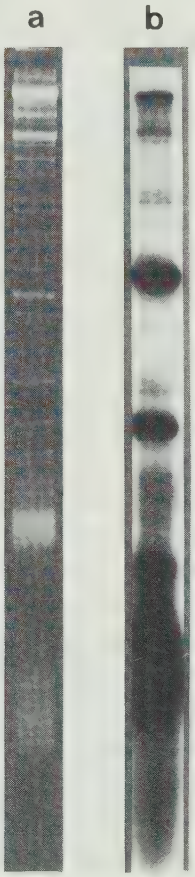


Abb. 19: Polysomale RNA von *S. lemnae*. (a) In einem 6% PAH-Gel aufgetrennte und mit Ethidiumbromid angefärbte polysomale RNA, (b) Am 5' Ende mit γ-^{32}P-ATP radioaktiv markierte und in einem 6% PAH-Gel aufgetrennte polysomale RNA. Die Autoradiographie zeigt, daß praktisch alle Banden der RNA durch die Kinase markiert sind. Die Reaktion dürfte an mRNA, die am 5'- Ende eine Cap-Struktur besitzen, nicht in diesem Ausmaß erfolgen. Diese RNA-Fraktion stellt offenbar keine mRNA dar.

3.5.3 Poly (A)$^+$ RNA

Es wurde versucht, Poly (A)$^+$ RNA unter den üblichen Standardbedingungen für Eukaryonten-RNA durch oligo-dT-Cellulose-Chromatographie anzureichern (2.3.3). Dabei zeigte sich, daß unter den Standardbedingungen nur eine sehr schwache Anreicherung von mRNA erfolgte und die eluierte RNA nach der Auftrennung im Gel praktisch dasselbe Bild wie die Gesamt-RNA bot (Abb. 20). So konnte z.B. die ribosomale RNA nicht effizient abgetrennt werden und im Bandenmuster der übrigen RNA-Moleküle konnten optisch keine Veränderungen festgestellt werden. Wurde nach der Elution der Poly (A)$^+$ RNA bei Raumtemperatur nochmals bei 37°C eluiert, so konnten nochmals geringe Mengen RNA erhalten werden, die sich aber im Bild ebenfalls nicht von der Gesamt-RNA unterschied. Die Ausbeute an 'Poly (A)$^+$ RNA' betrug maximal 2%. Hybridisierungen zeigten, daß sowohl α- und β-Tubulin mRNA etwa 5-10 fach angereichert wurden (Abb. 21). Wurden die Bindungsbedingungen in der oligo-dT-Cellulose Säule gelockert, um die Poly (A)$^-$ RNA weiter abzutrennen, so erfolgte eine äußerst geringe Ausbeute von weniger als 0,5% der Gesamt-RNA. Offensichtlich macht der hohe A-Anteil der nichtcodierenden Regionen der *S. lemnae*-mRNA und wahrscheinlich des Großteils der anderen RNA-Klassen eine effiziente Anreicherung von polyadenylierter RNA mit Standardmethoden schwierig. Eine Anreicherung der α- und auch β-Tubulin mRNA um das 5-10 fache unter den angegebenen Bedingungen ist auch durch den hohen A-Anteil in den nichtcodierenden Regionen dieser Molekülen möglich, ohne daß ein echter Poly (A)-Schwanz vorhanden sein müsste. Diese Ergebnisse, die oben erwähnten Befunde (3.5.) und die Ergebnisse der c-DNA Synthese (3.5.6) ließ es notwendig erscheinen, die RNA auf das Vorhandensein von echter Poly (A)$^+$ RNA zu untersuchen (s. 3.5.5).

3.5.4 RNA-Hybridisierungen

Die β-Tubulin-mRNA wurde durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Proben identifiziert (2.6.3; 2.7.3). Bei vollständig DNase verdauten Proben trat sowohl in der Gesamt- als auch in der Poly (A)$^+$ RNA (3.4.4) stets nur eine Bande von ca. 1,4 b Länge auf (Abb. 21). Dies deutet daraufhin, daß hypothetische Vorläufermoleküle eine sehr kurze Halbwertszeit besitzen und das 3'-Processing sehr schnell beendet werden müsste, oder aber, daß die Transkription am definitiven 3'-Ende der mRNA terminiert wird (vgl. 3.2.4.2; 3.2.4.3). Die Länge der mRNA mit ca. 1,4 kb, bestimmt durch Vergleich mit

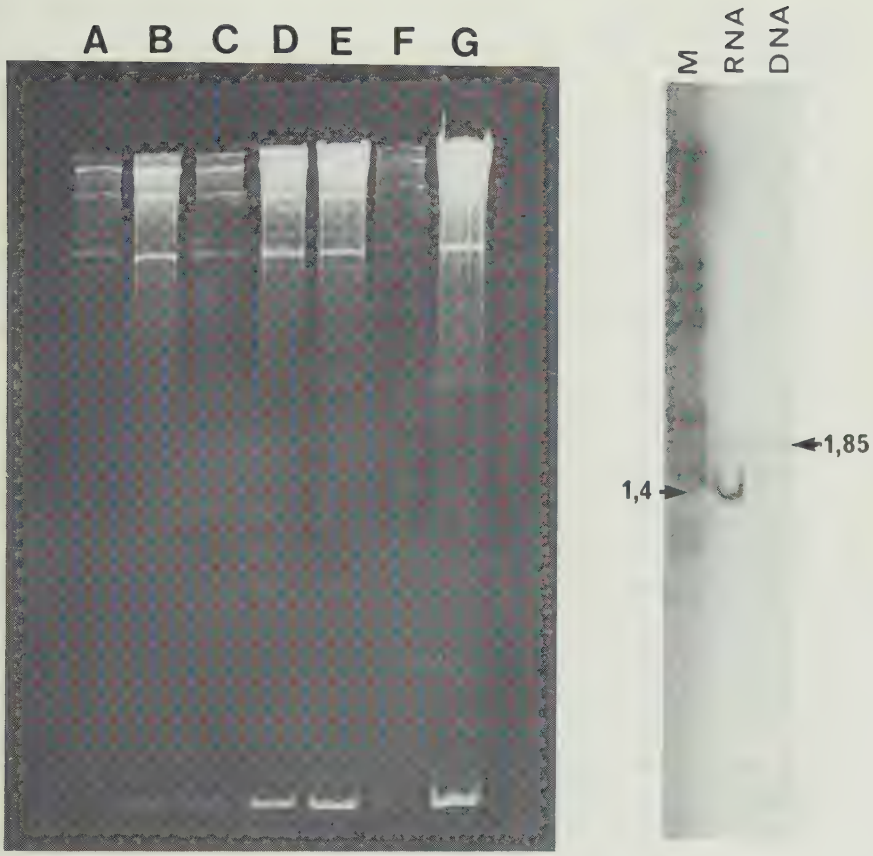


Abb. 20: 'Poly (A)⁺-RNA' Anreicherung. Elektrophoretische Analyse (6% PAH-Gel) der über eine oligo-(dT)-Cellulose Saule getrennten RNA-Fraktionen. Die 'Poly (A)⁺-RNA' Fraktionen (A, B; 0,4 und 1,5 µg bei 37°C eluiert; C, D; 0,7 und 2,5 µg bei Raumtemperatur eluiert), unterscheiden sich optisch nicht von der 'Poly (A)⁻-RNA' (F, G; 0,4 und 2,5 µg) und von der Gesamt-RNA (E; 3 µg).

Abb. 21: Identifizierung der β-Tubulin mRNA in Gesamt-RNA von *S. lemnae*. 6 µg Gesamt-RNA wurden in einem Glyoxalgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulosefilter transferiert und mit radioaktiven Proben aus den klonierten Makronukleusgenen hybridisiert. Es ist nur eine Großenklasse (1,4 kb) von β-Tubulingen-homologer RNA zu erkennen. In der parallel aufgetragenen Makronukleus-DNA sind die β-Tubulingene zu erkennen (1,85 kb).

DNA- und RNA-Referenzen, stimmt mit den durch die S_1-Experimente erzielten Ergebnisse (β1 mRNA = 1448 b, β2 mRNA = 1424 b; Conzelmann & Helftenbein, 1987) ziemlich genau überein. Käme ein Poly (A)⁺-Schwanz von 100-200 b Länge dazu, so wäre die gefundene Länge mit 1,4 kb für die β-Tubulin mRNA zu kurz. Auch mit einem RNA-Marker ('RNA-Ladder' von Pharmacia) wurde die β-Tubulin-mRNA-Länge von 1,4 kb bestätigt. Allerdings zeigen Moleküle mit einem Homopolymeranteil oft ein verändertes Laufverhalten, so daß aufgrund dieser Hybridisierungen nicht sicher entschieden werden kann, ob die Tubulin messenger polyadenyliert sind, oder nicht.

3.5.5 RNAse - Analysen der Gesamt-RNA.

Um das Vorhandensein von Poly (A)⁺ Tails in der Gesamt-RNA von *S. lemnae* zu untersuchen, wurde am 3'-Ende mit 5'-^{32}P-pCp radioaktiv markierte Gesamt-RNA (2.10.2.2) mit RNase A (Pyrimidin-spezifisch), RNase T_1 (G-spezifisch) und mit Kombinationen dieser beiden Enzyme vollständig verdaut (2.9.4). Bei den kombinierten Verdauen dürften unter den verwendeten Bedingungen nur Poly-A-Sequenzen nicht angegriffen werden. Zur Kontrolle wurden Aliquots der Ansätze anschließend mit RNase U_2, die nur bei A schneidet, verdaut. Als Kontrolle diente *Tetrahymena*-RNA, die eine Poly (A)⁺ Fraktion besitzt. Die Ansätze wurden in 8% PAH-Gelen aufgetrennt und die markierte RNA durch Autoradiographie sichtbar gemacht (Abb. 22). Die gefundenen Poly (A)⁺ Fragmente von *Tetrahymena* sind nur ca. 80 b lang, während die von *Stylonychia* um 130 b lang sind. Chlorogonium-RNA besitzt noch längere Poly (A)⁺ - Schwänze von etwa 160 b. Die Bereiche des Gels, in denen die Polyadenylate lagen, wurden herausgeschnitten, die Radioaktivität durch Liquid Scintillation Counting bestimmt und mit der Aktivität der unverdauten RNA verglichen. Danach sind ca. 5,5% der *S. lemnae*-RNA-Molekule polyadenyliert, Chlorogonium besitzt einen Poly (A)⁺ Anteil von 10%. *Tetrahymena*-RNA stand leider für die quantitativen Messungen nicht mehr zur Verfugung. Bei diesem relativ geringen Anteil an 'echter' Poly (A)⁺ RNA in *Stylonychia* bleibt die Frage, welche Moleküle der mRNA und besonders, ob die Tubulin messenger polyadenyliert sind, bestehen.

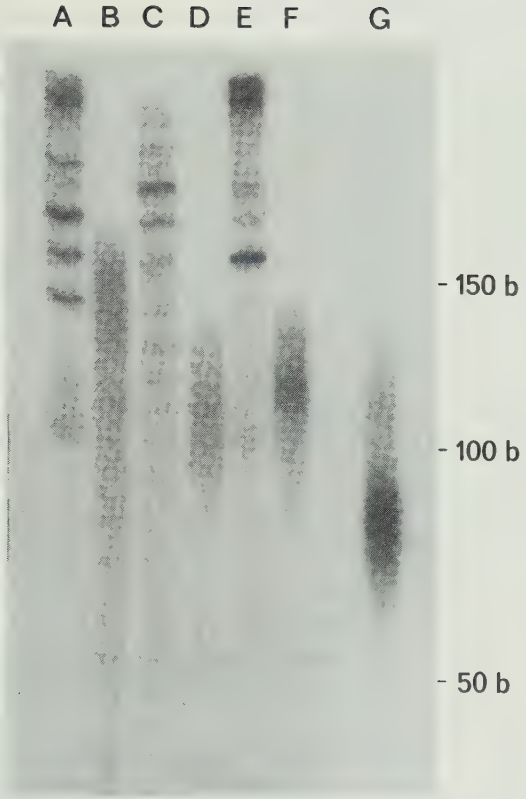


Abb. 22: Untersuchung des Poly (A)-Gehaltes und der Länge der Poly (A)-Tails in *S. lemnae*. Am 3'-Ende mit 5'-^{32}P-pCp durch die RNA Ligase radioaktiv markierte Gesamt-RNA wurde durch die RNasen T_1 (G-spezifisch) und A (Pyrimidin-spezifisch) komplett verdaut und in einem 8% PAH-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Autoradiographie zeigt die 3' terminalen resistenten poly (A)-Bereiche. Die Länge der Poly (A) Tails von *S. lemnae* liegt mit ca. 120 b zwischen denen von *Tetrahymena* (80 b) und Chlorogonium (150 b). Aus der vor dem Verdau eingesetzten Radioaktivität und der nach dem Verdau im Poly (A) haltigen Bereich des Gels gemessenen Aktivität konnte der Poly (A)-Anteil an der Gesamt-RNA von *Stylonychia* auf 5% geschätzt werden. A; *Chlorogonium* Gesamt-RNA; B; Verdaute *Chlorogonium RNA; C; Stylonychia* Gesamt-RNA; D; Verdaute *Stylonychia* RNA; E; verdaute *Tetrahymena* RNA.

3.5.6 C-DNA-Synthese

Da bei den RNA-Hybridisierungen nur eine Großenklasse von β-Tubulin-mRNA entdeckt wurde und damit nicht geklärt war, in welchem Verhältnis die β1- und β2-Tubulingene exprimiert werden, wurde versucht, diese Frage durch die Synthese von cDNA der Tubulin-Messenger und deren anschließende Restriktionsanalyse zu klären. Andererseits sollte das Vorhandensein eines Poly (A)-Tails am 3'-Ende der β-Tubulin-mRNA durch Primen des ersten Stranges mit oligo-(dT) und durch Ansequenzieren der cDNA untersucht werden. Auch wenn die mRNA Molekule nicht polyadenyliert wären, so wurden sie doch in geringem Umfang durch die Oligo-(dT)-Cellulose Säule angereichert und könnten so vielleicht auch durch Oligo-(dT) erfolgreich geprimt werden können.

Zur Synthese der cDNA nach Gubler & Hoffmann (1983; 2.12) wurde sowohl Gesamt-RNA als auch die in 3.5.3 beschriebene 'Poly $(A)^+$ RNA' eingesetzt. Es konnte in beiden Fällen cDNA synthetisiert werden, die dieselbe Größenverteilung zeigte wie die anfangs eingesetzte RNA (Abb. 23, vergl. Abb. 18) und die auch ähnliche Bandenmuster aufwies. Offenbar werden auch ribosomale- und andere RNAs, die in den besonders prominenten Banden vertreten sind, durch oligo-(dT) geprimt, wahrscheinlich aufgrund des hohen A Anteils in den nichtcodierenden Regionen der Molekule oder aber aufgrund starker Ruckfaltungsmöglichkeiten der nichtcodierenden Bereiche (vergl. 3.3.2.1), durch die eine Selbstprimung möglich wäre.

Die Enden der cDNA wurden durch Bal31-Verdau und eine anschließende Auffullreaktion mit dem Klenow-Fragment 'blunt end' gemacht (2.8.1; 2.8.2) und in den mit SmaI linearisierten pUC12 Vektor kloniert. Unter ca. 5000 untersuchten Klonen fand sich jedoch keiner, der β-Tubulingen-homologe DNA enthielt.

In einem neuen Ansatz wurde die cDNA mit den Restriktionsenzymen Eco R I und Kpn I verdaut, um schon bei der Klonierung in entsprechend geschnittene pUC12 Vektoren eine Anreicherung der β-Tubulin-cDNA zu erreichen. Eco R I / Kpn I Fragmente umfassen einen großen Teil der codierenden Regionen der beiden Tubulingene (3.2). Unter den rekombinanten Klonen fand sich lediglich einer, der bei der Koloniehybridisierung eine deutliche Reaktion zeigte. Die anschließende Restriktionsanalyse zeigte, daß die inserierte cDNA dem β2-Tubulin messenger zuzuordnen ist (Abb. 24).

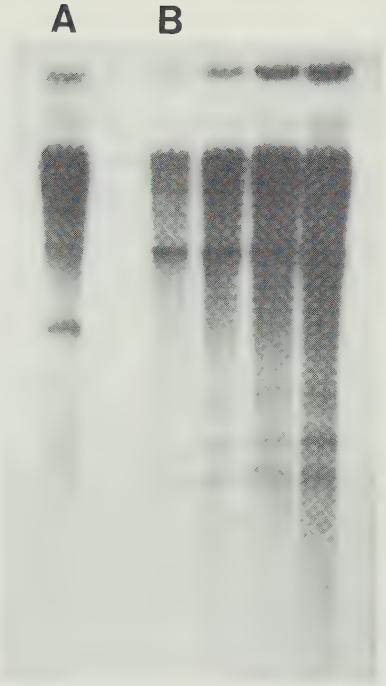


Abb. 23: Analyse der cDNA Syntheseprodukte in einem 5% PAH-Gel. Radioaktiv markierte DNA nach der Synthese des ersten Stranges (A) und des zweiten Stranges (B, nur der zweite Strang wurde in diesem Ansatz radioaktiv markiert).

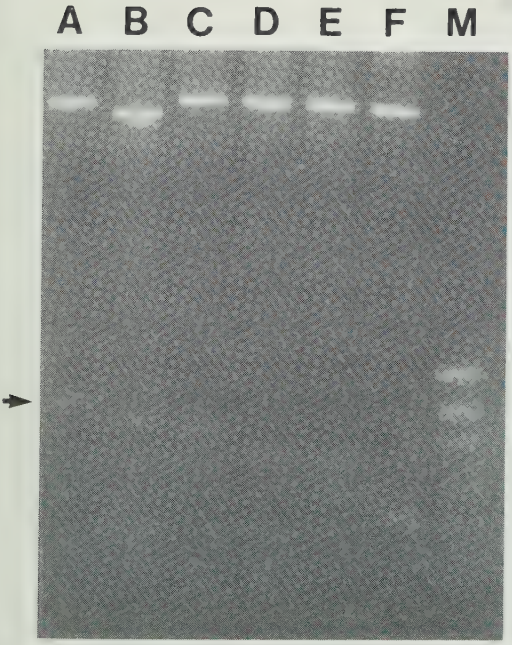


Abb. 24: Restriktionsanalyse des β2-Tubulin-cDNA Klons. Das mit PstI/BamHI geschnittene Plasmid (A) wurde mit weiteren Restriktionsenzymen verdaut (B-F). Dabei wird das Insert (360 bp; A; Pfeil) in die von der Restriktionskarte des β2 vorausgesagten Fragmente zerlegt A; PstI/BamHI; B; +PvuII; C; +SalI; D; +HindIII, E; +EcoRV F; +BaeI; M; pBR HinfI

4. DISKUSSION

Die beiden klonierten β-Tubulingene zeigen die typische Struktur der bisher untersuchten Makronukleus DNA-Moleküle von hypotrichen Ciliaten (Helftenbein, 1985; Kaine und Spear, 1982). Die codierenden Bereiche (48% G+C) sind nicht durch Introns unterbrochen. Die Gene besitzen relativ kurze nichtcodierende Regionen mit sehr hohem A+T Gehalt (75%), die durch terminale C_4A_4-Telomerstrukturen abgeschlossen werden. Diese sind allerdings verschieden lang und umfassen am 5'-Ende von β1 und am 3'-Ende von β2 28 bp, am 5'-Ende von β2 und am 3'-Ende von β1 nur 20 bp. Variable Längen der Repeats wurden ebenfalls an anderen Makronukleusmolekülen von *S. lemnae* beobachtet (Helftenbein & Müller, im Druck; Becker, Fritzenschaf, unveröffentlicht), wobei die Unterschiede immer ein Vielfaches der Einheit C_4A_4, also 8 bp umfassen, so daß diese Struktur im Gegensatz zur üblichen Darstellung

$$5'\text{-}C_4A_4C_4A_4C_4\text{---}$$
$$3'\text{-}G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4T_4G_4\text{---}$$

besser als

$$5'\text{-}(C_4A_4)_nC_4\text{---}$$
$$3'\text{-}G_4T_4G_4T_4(G_4T_4)_nG_4\text{---}$$

dargestellt werden sollte, wobei n nach den bisher vorliegenden Ergebnissen im Bereich zwischen 2 und 6 liegt.

Die typische Struktur der Moleküle und die Ergebnisse der RNA-Analysen und der cDNA Synthese (Conzelmann und Helftenbein, 1987) zeigen, daß beide β-Tubulingene von *S. lemnae* funktionell sind und exprimiert werden.

Auch die hohe Homologie der codierten Aminosäuresequenz zu den β-Tubulinen anderer Organismen bestätigt die Funktionalität der β-Tubulingene von *S. lemnae*. Die Homologie zu β-Tubulin Isotypen von Säugern (Maus, Mensch) ist erstaunlich hoch und liegt mit 89,6% nur wenig unter der zum β-Tubulin der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (90,8%). Die Lokalisation der divergenten Aminosäuren in variablen Bereichen des Proteins (z.B. am Carboxyterminus) und die strenge Konservierung der Aminosäuren in konservativen Bereichen (z.B. der Bereich AS 388-428, der an der Polymerisierung der Tubuline beteiligt ist [Serrano et al., 1984]) zeigt, daß die von den beiden Genen

codierten Proteine die Funktion des β-Tubulins in *S. lemnae* übernehmen können.

Das β2 Gen besitzt in der codierenden Region ein TAA-Codon. In dieser Position weisen alle bisher untersuchten β-Tubuline anderer Organismen ohne Ausnahme die Aminosäure Glutamin auf. Dies bestätigt noch einmal den Befund, daß bei den Ciliaten eine Abweichung vom universellen genetischen Code auftritt und das Codon TAA nicht wie bei anderen Eukaryonten als Stopcodon (ochre) fungiert, sondern die Aminosäure Glutamin codiert (Helftenbein, 1985). In den β-Tubulingenen von *S. lemnae* wird Glutamin lediglich von den Codons CAA und TAA codiert. Dagegen findet sich das dritte mögliche Glutamin-Codon CAG nur zweimal im α1-Tubulingen (Helftenbein, 1985), nicht jedoch im α2 (Helftenbein & Müller, submitted) und in verschiedenen anderen Genen von *S. lemnae* (Becker, Fritzenschaf, unveröffentlicht). Das amber Codon TAG, das in holotrichen Ciliaten wie *Paramecium* und *Tetrahymena* ebenfalls Glutamin codiert (Caron & Meyer, 1985; Horowitz & Gorovsky, 1985; Kuchino et al., 1985; Preer et al., 1985), wurde bei einem hypotrichen Ciliaten noch nie gefunden. Als Stopcodon der β-Tubulingene von *S. lemnae* fungiert wie in allen bisher untersuchten Ciliatengenen TGA (opal).

Die Tatsache, daß das β1 Gen anstelle des TAA Codons in Position 571 ein CAA Codon besitzt, deutet darauf hin, daß sich die beiden Gene aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül entwickelt haben könnten, das noch nicht die Veränderungen im genetischen Code der Ciliaten zeigte. Dies unterstützt die Hypothese von Horowitz & Gorovsky (1985), die vermuten, daß die Änderung des Codes erst nach der Trennung der Ciliaten von den Vorfahren der anderen Eukaryonten erfolgte. Ob die hypotrichen Ciliaten auch das Codon TAG für Glutamin benutzen können, oder ob dies eine Synapomorphie der Holotrichen darstellt, bleibt weiterhin ungeklärt. Das Codon TAA wird von den Holotrichen weitaus häufiger benutzt als von den Hypotrichen und es stellt sich die Frage, ob die Hypotrichen den Holotrichen in der Veränderung des genetischen Codes hinterherlaufen, oder ob sie sich wieder in eine entgegengesetzte Richtung 'zurück'entwickeln.

Auch bei der Benutzung der anderen Codons zeigen sich bei den β-Tubulingenen von *S. lemnae* deutliche Unterschiede zu höheren Eukaryonten. Es ist eine

Tendenz zur Reduzierung der Anzahl der benutzten Tripletts festzustellen. Dabei wird vor allem auf Codons, die mit G enden, verzichtet, und diese durch Codons mit C an dritter Position ersetzt. Die Codonbenutzung in den α-Tubulingenen ist nahezu identisch und auch zum Aktingen von *Oxytricha fallax* bestehen kaum Unterschiede. Ob die beschriebene Codonauswahl generell für Ciliatengene gilt, oder ob, wie bei der Hefe und in *E. coli* gefunden wurde, in verschieden stark exprimierten Genen unterschiedliche Codons benutzt werden, (Bennetzen & Hall, 1982; Ikemura, 1981; 1985), bleibt zu untersuchen.

Bei höheren Eukaryonten (Insekten, Vögel, Säuger) werden die Tubuline durch meist große Multigenfamilien codiert (Reviews: Cowan, 1984; Cleveland & Sullivan, 1985). Vor allem die β-Tubulingene weisen innerhalb einer Species eine deutliche Varianz auf und es wird vermutet, daß diese Tubulin-'Isotypen' (Hall et al., 1983) spezielle Funktionen erfüllen und in funktionell unterschiedliche Mikrotubuli eingebaut werden. Meist unterliegen die verschiedenen β-Tubulingene differentieller Regulation innerhalb einer Zelle oder innerhalb des Organismus in verschiedenen Organen und Geweben (Bialojan et al., 1984; Bond & Farmer, 1983; Hall & Cowan, 1985; Rudolph et el., 1987; Sullivan et al., 1986).

Im Gegensatz dazu scheint bei den niederen Eukaryonten ein einziges β-Tubulin ausreichend zu sein, um die an die Mikrotubuli gestellten verschiedensten Aufgaben innerhalb der Zelle zu erfüllen: Wie in den vorliegenden Ergebnissen gezeigt wurde, codieren die beiden β-Tubulingene von *S. lemnae* ein identisches Protein. Die beiden β-Tubulingene von *Chlamydomonas* führen ebenfalls zu identischen β-Tubulinen (Youngblom et al., 1986). Die Hefe besitzt ein einziges β-Tubulingen (Neff et al. 1983) und auch bei *Tetrahymena* wurde bislang nur ein einziges Gen für β-Tubulin identifiziert (Guttman & Gorovsky, 1979).

Darüberhinaus scheint bei niederen Eukaryonten auch ein einziges α-Tubulin zu genügen, um alle Funktionen in der Zelle zu erfüllen. Es wurde gezeigt, daß jedes der beiden α-Tubulingene der Hefe die Funktion des anderen übernehmen kann und funktionell, trotz des Sequenzunterschiedes von ca. 10%, zwischen den beiden Tubulinen kein Unterschied besteht. Lediglich die Expression der Gene wird unterschiedlich gesteuert und zusätzliche Kopien des schwach

exprimierten Genes können die Defekte, die durch eine Nullmutation des stark exprimierten Genes entstehen, völlig supprimieren (Schatz et al., 1986). Entsprechende Ergebnisse wurden bei den beiden α-Tubulingenen von *Schizosaccharomyces pombe* erzielt (Adachi et al., 1986).

Auch die β-Tubulingene von *Chlamydomonas*, die für identische Proteine codieren, werden differentiell reguliert (Brunke et al., 1982; Silflow & Rosenbaum, 1981; Youngblom et al., 1986). Eine Erklärung für das Vorliegen von zwei oder mehreren Genen, die funktionell gleiche oder identische Proteine codieren, liegt einerseits in der Wirtschaftlichkeit. Die beiden (oder mehrere) Gene können 'Arbeitsteilung' praktizieren. So kann eines der Gene das regelmäßig benötigte Protein des Grundhaushalts bereitstellen, während das andere lediglich bei 'Sonderaufgaben', etwa bei Regenerationsvorgängen oder in bestimmten Stadien des Zellzyklus wie z.B. bei Zellteilungen, zum Einsatz oder zum verstärkten Einsatz kommen kann. Werden diese Vorgänge durch ein einzelnes Gen erfüllt (wie z.B. bei der Hefe), so muß ein komplizierter Regulationsmechanismus postuliert werden, in den verschiedenste regulative Proteinfaktoren und zahlreiche Erkennungs- und Bindungsstrukturen in den regulativen Bereichen des Gens involviert sind. Sind jedoch zwei oder mehrere Gene vorhanden, so käme das Gen, das 'Haushaltsfunktionen' erfüllt, im einfachsten Falle ganz ohne regulative Mechanismen, mit konstitutiv niedriger Transkriptionsrate, aus und für das andere Gen würde ein einfacher ein/aus- oder schwach/stark- Mechanismus, mit relativ hoher Transkriptionsrate, genugen. Andererseits kann die differentielle Expression der Gene mit posttranslationellen Modifizierungsmechanismen gekoppelt sein und so letztendlich doch zu funktionell unterschiedlichen Proteinen, die verschiedene Aufgaben in der Zelle übernehmen können, führen. Das cytoplasmatische α-Tubulin von *Chlamydomonas* z.B. kann posttranslationell zu Flagellar-Tubulin modifiziert werden. Der Vorgang ist eng gekoppelt mit dem Assembling-Prozeß (Lefebvre et al., 1980).

Diese Überlegungen und vor allem der Befund der sehr unterschiedlichen nichtcodierenden Regionen (s.u.) sprechen dafür, daß auch die beiden β-Tubulingene von *S. lemnae* differentiell exprimiert werden können.

Auch die Ergebnisse der Bestimmung der Kopienzahl im Makronukleus deuten auf eine differentielle Regulation der beiden Gene hin. Genau wie bei den beiden α-Tubulingenen liegt eines der Gene hochamplifiziert im Makronukleus vor (β1: 150.000 Kopien; α1: 100.000 Kopien [Helftenbein, pers. comm.]), während das andere jeweils 5 mal weniger häufig vorkommt (β2: 30.000; α2: 20.000 [Helftenbein, 1985]). Die Erhaltung dieses 5:1 Verhältnisses bei den α- und β-Tubulingenen spricht dafür, daß die Kopienzahlen dieser sehr wahrscheinlich koordiniert regulierten Gene bei der differentiellen Expression eine Rolle spielen.
Die Kopienzahlen der α- und β-Tubulingene liegen deutlich über dem theoretisch errechneten Durchschnittswert spezifischer Makronukleusmolekule von ca. 15.000 Kopien pro Makronukleus (Kraut et al. 1986). Allerdings sind noch sehr viel höhere Kopienzahlen gefunden wurden, z.B. 600.000 für die rDNA (Lipps und Steinbrück, 1978) und über 3 Millionen für ein überamplifiziertes Gen in einigen *S. lemnae* Klonen (pOB; Helftenbein et al., submitted). Eine Veränderung der Kopienzahlen im Laufe der Alterung der Klone, wie sie bei pOB zu beobachten ist, wurde bei den Tubulingenen nicht festgestellt.

Die Ähnlichkeiten der beschriebenen Hairpinstrukturen in der Nähe der terminalen C_4A_4 Repeats und der angrenzenden Sequenzen zu den α1- und α2-Hairpins und zu den Hairpins des pOB, die in heterologen Maus L-Zell Systemen die Replikation initiieren können (Helftenbein et al., submitted), legen die Vermutung nahe, daß diese Strukturen die Replikationsorigins der Makronukleusmoleküle darstellen. Während die α- und β-Tubulingene, deren Kopienzahl konstant bleibt, jeweils einen dieser Hairpins besitzen, liegen in der 5' nichtcodierenden Region des pOB kurz hintereinander drei Hairpins. Die Überamplifikation des pOB während der Klonentwicklung beruht also wahrscheinlich auf mehrfacher Initiation der Replikation im Makronukleus vor der Zellteilung.

Die nichtcodierenden Regionen der beiden β-Tubulingene sind mit 126 und 170 bp (5' β1 und β2) und 343 und 284 bp (3' β1 und β2) in der Größenordnung, die man auch bei anderen Genen von hypotrichen Ciliaten findet (Helftenbein, 1985; Helftenbein & Muller, submitted; Kaine & Spear, 1982). Lediglich der 5'-

nichtcodierende Bereich des α2-Tubulin Genes stellt mit nur 74 bp Länge eine Ausnahme dar.

Die nichttranslatierten Bereiche der β-Tubulin mRNAs sind extrem kurz (5'β1: 46 b, 5'β2: 38 b, 3'β1: 73 b, 3'β2: 57 b), ähnliche Längen wurden auch bei den α-Tubulin Messengern gefunden (Helftenbein & Müller, 1987; Helftenbein & Conzelmann, submitted). Die nichtcodierenden Bereiche der Messenger anderer Organismen umfassen am 5' Ende 20 bis 80 Basen (Kozak, 1984), am 3'-Ende sind sie mit einige hundert bis über tausend Basen (Birnstiel et al., 1985) sehr viel länger. Die mRNA der hypotrichen Ciliaten ist äußerst kompakt organisiert und alle fur eine erfolgreiche Translation erforderlichen Signale sind offensichtlich auf minimalem Raum konzentriert. Die Holotrichen stellen in diesem Zusammenhang eine Zwischenform dar; die nichttranslatierten Bereiche der Histon H4 und H2B mRNAs von *Tetrahymena* sind zwischen 100 und 300 b lang (Horowitz et al., 1987; Nomoto et al., 1987).

Auf Sequenzebene lassen sich zwischen den 5' und zwischen den 3' nichtcodierenden Regionen der beiden β-Tubulingene von *S. lemnae* wenige Ähnlichkeiten feststellen. Direkte Sequenzhomologien, wie sie in den beiden α-Tubulingenen direkt vor dem ATG und nach dem Stopcodon TGA auftreten, fehlen bei den β-Tubulingen. Der längste homologe Abschnitt der 5' Leader liegt 1 (β1) bzw. 10 bp (β2) vor dem ATG Startcodon und umfasst 18 bp. Ähnlichkeiten zu dieser Sequenz sind in den Leadern der beiden α-Tubulingene zu finden, besonders im α1 (Pos. -25). Größere Abweichungen treten im α2 auf (Pos. -24). Da diese konservative Sequenz noch innerhalb des transkribierten Bereichs liegt, könnte sie eine Rolle bei der Translationsregulierung spielen, z.B. bei der Bindung der mRNA an die Ribosomen.

Die Umgebung des ATG Startcodons in β1 kommt der optimalen Sequenz für die Initiation der Translation bei Eukaryonten (Kozak, 1986) sehr nahe, die des β2 ähnelt mehr der Consensussequenz der Hefe (Hamilton et al., 1987), während die der α-Tubulingene mit dem Consensus der Vertebraten identisch sind (Cavener, 1987). Allen vier Tubulingenen von *S. lemnae* ist jedoch das A in Position -3 und ein Pyrimidin in Position -2 gemeinsam. Dies sind in allen oben angeführten Consensussequenzen hoch konservierte Strukturen (Kozak 1981, 1984).

Bei der Computeranalyse der nichtcodierenden Regionen wurden keine längeren signifikanten Übereinstimmungen gefunden. In den 3' nichtcodierenden Regionen der β-Tubulingene ist ein gemeinsames Oligonukleotid der Sequenz GCTTTCAC zu finden. In beiden Genen liegt diese Sequenz in vergleichbarer Position und ist vielleicht von funktioneller Bedeutung. Allerdings taucht diese Sequenz nicht in den α-Tubulingenen und auch nicht im Aktingen von *O. fallax* auf. Die β2- und α1-Tubulingene besitzen ebenfalls in der 3' nichtcodierenden Region ein gemeinsames Dodekamer der Sequenz TTTATTAAAAT; dies ist wiederum in keinem der anderen Gene zu finden und scheint in der A+T-reichen nichtcodierenden Region nicht signifikant zu sein.

Während die von Eukaryonten bekannten Signale wie CAAT-Box und GC-Box, die bei der Bindung der RNA-Polymerase beteiligt sind, in keinem der β-Tubulingene gefunden wurden und auch in den α-Tubulingenen fehlen, konnte eine typische TATA-Box 22 bp oberhalb des Transkriptionsstartpunktes im β2 identifiziert werden. Zwei weitere TATA-Box ähnliche Sequenzen in der 5' nichtcodierenden Region des β2 scheinen aufgrund ihrer Lage relativ zum Startpunkt der Transkription keine funktionelle Bedeutung zu haben. In der 5' nichtcodierenden Region des β1 dagegen, findet sich überhaupt keine Sequenz, die einer Hogness-Box oder deren möglichen Varianten (Baker et al., 1979; Bucher & Trifonov, 1986) ähnlich ist. Dies ist bei dem hohen A+T-Gehalt der nichtcodierenden Regionen überraschend.

An der Position der TATA-Box des β2 (TATAAAT; 22 bp oberhalb des Startpunktes) besitzt β1 die Sequenz TTTAAAT. Gegenüber der TATA-Box von β2 ist also lediglich ein A gegen ein T ausgetauscht. Bei der Untersuchung des G+C-Gehaltes wurde festgestellt, daß diese Sequenz, wie auch die TATA-Box von β2 zwischen zwei für die nichtcodierenden Regionen extrem G+C reichen Abschnitten liegt. Direkt nach dem zweiten GC-Peak beginnt in beiden Genen ein Bereich, der sehr A+T reich ist und sich bis kurz vor das Startcodon ATG erstreckt. Etwa 10 bp nach dem zweiten GC-Peak beginnt auch in beiden Genen die Transkription. Bei Untersuchung der α-Tubulingene auf ähnliche Strukturen wurden fast identische Verhältnisse gefunden (Helftenbein & Conzelmann, submitted) und auch die Sequenzen der kürzlich veröffentlichten Histongene von *Tetrahymena* weisen überraschend ähnliche Strukturen auf (H4: Horowitz et al., 1987; H2B: Nomoto et al., 1987).

Offensichtlich stellt die beschriebene Struktur einen Promotor oder einen Bestandteil eines Ciliatenpromotors dar. Ob die Sequenz der 'TATA-Boxen' ein entscheidendes Kriterium ist, oder lediglich eine A+T Sequenz zwischen zwei GC-Blöcken vor einem A+T reichen Abschnitt ausreichend ist, und ob die Sequenzhomologie zu den Hogness-Boxen anderer Eukaryonten zufällig besteht, muß untersucht werden. Nicht alle 'TATA-boxen' der Ciliatengene, die in einer solchen Promotorstruktur liegen, können die Polymerase so positionieren, daß die Transkription nur an einem einzigen Punkt beginnt:

α1:	TATAAAA	1 Startpunkt(e)
β2:	TATAAAT	1
α2:	TATAAAT	1
β1:	TTTAAAT	1
H2B2:	TTTAAAT	1
H4II:	ATTAAAT	2
oder	TATTAAT	2
H2B1:	AAAAAAA	2
H4I:	TTTAAAA	3

Lediglich die TATA-Boxen von α1, α2 und β2 stellen von anderen Eukaryonten bekannte TATA-box Variationen dar. Alle anderen Sequenzen wurden nicht als mögliche Variationen beschrieben, einige davon sind aber offensichtlich in der Lage, die Polymerase richtig zu positionieren. Im Actingen von *Oxytricha fallax* wurden drei Hogness-Boxen gefunden (Kaine & Spear, 1982), doch leider liegen hier noch keine Daten über den oder die Transkriptionsstartpunkte vor.

Die mRNAs der β-Tubuline sind den 3'nichtcodierenden Regionen der Gene bis zu den Nukleotiden +73 (β1) und +57 (β2) homolog. In diesen Bereichen liegen keine Stemloops, die auf eine Termination der Transkription durch einen Prokaryonten-ähnlichen Mechanismus hindeuten (Platt, 1986). Aber auch keine eukaryontischen Signale, die an einer Termination beteiligt sein könnten (Birnstiel et al., 1985; Grass, 1987; Ryner & Manley, 1987), sind zu identifizieren. Ob die Transkription der gene-sized pieces überhaupt gestoppt werden muß, ist zweifelhaft. In *S. lemnae* sind allerdings mit den beschriebenen Hybridisierungen keine RNA-Vorlaufermolekule zu entdecken, lediglich

die mRNA (1,4 kb) ist sichtbar. Die Schnelligkeit des 3' RNA-Processings macht auch in Eukaryonten, die die Transkription terminieren, eine Untersuchung der Vorgänge äußerst schwierig (Birnstiel et al., 1985). Das kanonische Polyadenylierungssignal AATAAA scheint beim RNA-Processing oder bei der Termination in *S. lemnae* keine Rolle zu spielen. Entweder es tritt überhaupt nicht auf, wie zum Beispiel in β1 und α1, oder es liegt an Positionen, die weit entfernt (meist unterhalb) vom 3'-Ende der mRNA liegen (β2, α1). Entweder besitzen die hypotrichen Ciliaten spezifische Signale, die die Polyadenylierungsstellen kennzeichnen, oder die mRNA wird nicht polyadenyliert.

Die zweite Möglichkeit scheint die wahrscheinlichere zu sein. Die geringfügige Anreicherung sowohl der α- als auch der β-Tubulin mRNA durch oligo-dT-Cellulose Chromatographie ist durchaus durch kurze A-reiche Abschnitte in den nichtcodierenden Regionen der RNA möglich, ebenso das (mehr oder weniger) erfolgreiche Primen von cDNA mit oligo dT. Die magere Ausbeute bei der cDNA Synthese macht einen längeren poly-A-Schwanz zumindest bei den β-Tubulin mRNAs unwahrscheinlich. Auch das Vorhandensein von Poly A-Tails an der Histon-mRNA von *Tetrahymena* (Bannon et al., 1983) wurde in letzter Zeit kritisch überdacht und die Möglichkeit der Anreicherung der Histon mRNA in oligo dT-Säulen durch den hohen A-Gehalt der nichtcodierenden Regionen nicht ausgeschlossen (Horowitz et al., 1987; Nomoto et al., 1987). Es wurde bisher noch in keinem cDNA Klon von hypotrichen Ciliaten eine längere Poly A Sequenz am 3'Ende durch Sequenzanalyse nachgewiesen.

Die quantitative Bestimmung von Poly-A-Sequenzen in dieser Arbeit scheint deutlich zu machen, daß bei *S. lemnae* zumindest weniger Poly-A-Sequenzen vorliegen, als bei anderen Eukaryonten beobachtet. Es handelt sich bei dieser Bestimmung jedoch um einen Einzelversuch und es muß auf einige Unwägbarkeiten hingewiesen werden: 1.) Die Markierung mit pCp durch die RNA-Ligase erfolgt wahrscheinlich nicht statistisch an jedem Molekul, 3'-poly-A-Enden können bevorzugt werden oder schlechter markiert werden (Krug & Berger, 1986). 2.) Die Bedingungen für die Verdaue sind wahrscheinlich nicht optimal und führen zu erhöhten Werten (unvollständiger Verdau) oder zu niedrigen Werten (zu viel RNase, zu hohe Temperaturen, zu langer Verdau). 3.) Es fehlen Standardkontrollen. Um genauere Ergebnisse zu erzielen, müssen optimale

Bedingungen ausgearbeitet und die Versuche standardisiert werden. Umfangreiche Kontrollen und Referenz-RNAs bekannter Zusammensetzung sind vorzusehen.

Unmittelbar bei den 3' Enden der RNAs ist in den β-Tubulingenen ein gemeinsames Heptanukleotid zu finden. Aufgrund der erhöhten Homologie in diesem Bereich der gesamten 3' nichtcodierenden Region und der gleichen Positionierung scheint dieses Signal signifikant zu sein. Auch in den α-Tubulingenen liegen um das 3'-Ende der mRNA vergleichbare Sequenzen:

```
α1        TTCGCCCACACAGGCCTAAACCAAACTAGAACC
β1        ATTTTTCTCTAAGATCTAAACAATAATCTATTC
β2        ACAATTCCACCACCTCTAAACTTTCTTTATATA
α2        GGAGGCACCGAAACCATAAACTTAATTTTGTAA
mRNAs:                     ↑   ↑
                           ↑   β1
                           ↑
                      α1, α2, β2
```

Das letzte Nukleotid der einzelnen mRNAs ist durch die Pfeile gekennzeichnet. Allen vier Tubulingenen ist das Pentanukleotid TAAAC gemeinsam. Diese Sequenz findet sich in allen Genen meist mehrfach in den 3' nichtcodierenden Bereichen, doch endet die mRNA in allen Fällen am ersten TAAAC nach der codierenden Region. Es ist deshalb zu vermuten, daß diese Sequenz ein Signal oder wenigstens einen Teil eines Signals darstellt, das entweder bei der Transkriptionstermination oder aber, was wahrscheinlicher erscheint, beim 3'-Processing der mRNA von *S. lemnae* beteiligt ist.

Die Besonderheiten der 'gene-sized pieces' bieten, wie in der Einleitung beschrieben, hervorragende Möglichkeiten, regulative Signale der Makronukleusmoleküle zu untersuchen. Allerdings müssen aufgrund der besonderen Struktur dieser Moleküle auch bestimmte Überlegungen angestellt werden, wenn die Befunde mit denen 'normaler' Eukaryonten verglichen werden sollen.

Durch die Umorganisation des genetischen Materials während der Makronukleusentwicklung liegen völlig andere Verhältnisse vor, als man sie bei

anderen Eukaryonten findet und es entfallen bei der Expression der Makronukleusgene einige Voraussetzungen, die bei anderen Eukaryonten bestehen: Während im normale Zellkern die zu transkribierende DNA einen geringen Bruchteil der DNA ausmacht, liegen im Makronukleus praktisch nur noch diese Sequenzen vor (Nock, 1981). So müssen hier vom Transkriptionsapparat nicht mehr die relevanten DNA-Sequenzen identifiziert werden, und es können somit die Signale entfallen, die diese DNA innerhalb eines Zellkerns charakterisieren. Eine Transkriptionstermination an bestimmten Stellen im Molekul ist theoretisch nicht nötig, da die kurzen Makronukleusmoleküle ohne weiteres vollständig transkribiert werden können. Die RNA-Polymerase mußte im Prinzip also lediglich ein Signal, das die Richtung der Transkription und somit den zu transkribierenden Strang vorgibt, erkennen können. Für diesen Zweck ist die beschriebene Promotorstruktur völlig ausreichend. Ob die Promotoren auch die Transkriptionsrate beeinflussen, muß untersucht werden. Die Initiationshäufigkeit könnte theoretisch durch die Kopienzahl der Gene im Makronukleus einfachst determiniert werden. Die Befunde, daß die relative Häufigkeit spezifischer mRNAs und der korrespondierenden DNA Molekule um den Faktor 20-30 variiert (Simon, 1985; Wieser 1984), könnte durch eine unterschiedliche Halbwertszeit der mRNA Moleküle (durch Sekundärstrukturen und/oder Proteinfaktoren beeinflußt) erklärt werden. In den gene-sized pieces der hypotrichen Ciliaten müssen deshalb nicht unbedingt alle transkriptionsregulierenden Sequenzen oder Strukturen der 'normalen' Eukaryonten gefunden werden. Die Länge der 5' nichtcodierenden Region des α2-Tubulingens mit lediglich 74 bp macht dies deutlich. Mit der Promotorsequenz, der konservierten Sequenz vor dem ATG (Translation?) und dem Replikationsorigin ist das gesamte Raumangebot der nichtcodierenden Region erschöpft. Dies impliziert auch, daß bei den hypotrichen Ciliaten eine Polymerase vorliegen könnte, die sich deutlich von der Polymerase II 'normaler' Eukaryonten unterscheidet. Die unterschiedlichen nichtcodierenden Bereiche der für identische Proteine codierenden β-Tubulingene sprechen allerdings für eine regulierbare Transkription, die vielleicht durch Ciliaten-spezifische Signale ermöglicht wird.

Auch der RNA-Processing-Apparat der hypotrichen Ciliaten könnte einfach aufgebaut sein. Die Excision von Introns ist nicht mehr nötig, da dies durch die Entfernung von 'DNA-Introns' (IESs) bereits während der Makronukleusentwicklung auf DNA-Ebene geschehen ist (Klobutcher, 1984; 1986). Ein RNA-

Intron - Processing und die darin involvierten Faktoren wären verzichtbar. Die Polyadenylierung bei Eukaryonten ist mit der Termination der Transkription eng gekoppelt (Birnstiel et al., 1985) und ist, wenn nicht terminiert wird, vielleicht überflüssig. Die Stabilität der RNA, die bei Eukaryonten zum Teil auf die Polyadenylierung zurückgeführt wird, ist auch durch Sekundärstrukturen der RNA, eventuell assoziiert mit Proteinen, zu gewährleisten. Andererseits könnte, wenn bei (bestimmten?) RNA-Molekulen ein 3'-Processing durchgeführt werden muß, dies durch andere als von den Eukaryonten bekannten Mechanismen vollbracht werden (s. rRNA-Selfsplicing bei *Tetrahymena* [Cech, 1985; Cech und Bass, 1986]).

Die erwähnten unabdingbaren Signale der Makronukleusmolekule sind mit dem Replikationsorigin, dem Promotor und einer Sequenz, die wahrscheinlich das 3'-Ende der mRNA determiniert, gefunden worden. Weitere Experimente, durch die die Transkriptionsrate der Gene bestimmt werden kann, und Experimente zur differentiellen Regulation werden durch die nun bekannte Struktur und Sequenz der Gene wesentlich erleichtert. Ebenfalls sollte es möglich sein, die Funktion der entdeckten Signalsequenzen durch Mutationen entweder *in vitro* oder *in vivo* zu untersuchen. Die kürzlich entwickelten Methoden zur Transformation von *S. lemnae* bieten hierzu viele Möglichkeiten (Meyers und Helftenbein, 1987; Wünning und Lipps, 1983).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Durch Hybridisierung mit einer heterologen Probe wurde im Makronukleus des hypotrichen Ciliaten *Stylonychia lemnae* eine Großenklasse von DNA Molekulen identifiziert, die für β-Tubulin codiert. Diese enthält zwei verschiedene Typen von Molekülen (β1 und β2), die sich durch Restriktionsanalyse unterscheiden lassen. Vertreter beider β-Tubulingene wurden kloniert und sequenziert.

Durch Vergleichshybridisierungen wurden die Kopienzahlen der β-Tubulingene im Makronukleus bestimmt. Danach liegt das β1 Gen in 150.000 Kopien, das β2 Gen in 30.000 Kopien pro Makronukleus vor.

Die beiden β-Tubulingene besitzen einen ähnlichen Aufbau: Die codierenden Regionen (~45% G+C, 1329 bp), die keine Introns besitzen, werden von unterschiedlich langen, A+T reichen (~25% G+C) nichtcodierenden Regionen flankiert (β1: 5' 126, 3' 343 bp; β2 5' 170, 3' 284 bp). Terminale invertierte C_4A_4 Repeats von 20 bp (5'β1 und 3'β2) und 28 bp (3'β1 und 5'β2) Länge fungieren als Telomerstrukturen. Die Länge der klonierten Gene ist damit also 1846 bp (β1) und 1831 bp (β2).

Die codierenden Regionen der beiden Gene sind zu 97,2% homolog und codieren ein identisches Protein (MG 49.427), das eine hohe Homologie zu den β-Tubulinen höherer Eukaryonten zeigt (88-90%). Das β1 Gen besitzt im Leseraster ein TAA Codon, das Glutamin codiert. Das Codon TAG, das in holotrichen Ciliaten ebenfalls Glutamin codieren kann, wurde jedoch nicht gefunden. Von den möglichen 64 Codons werden in den β-Tubulingenen nur 43 (β1) oder 40 (β2) benutzt. Vor allem Codons, die mit G enden, werden selten benutzt.

Die nichtcodierenden Regionen sind in ihrer Sequenz sehr unterschiedlich und besitzen nicht alle regulativen Sequenzen, die von anderen Eukaryonten bekannt sind. In den 5' nichtcodierenden Regionen wurde eine Promotorstruktur identifiziert, die aus einer TATA-Box-ähnlichen Sequenz, flankiert von G+C-

reichen kurzen Abschnitten, besteht. Dicht vor dem ATG Startcodon liegt ein konservierter Bereich, der an der Translationskontrolle beteiligt sein könnte. Konservierte Hairpinstrukturen, die in beiden Genen dicht bei den 5' terminalen Repeats liegen fungieren vermutlich als Replikationsorigins der Moleküle.

Die 3' nichtcodierenden Bereiche besitzen in den Regionen, die den 3' Enden der mRNAs entsprechen, eine Consensussequenz, die vermutlich am RNA 3' Processing beteiligt ist. Nur das ß2 Gen besitzt das eukaryontische Polyadenylierungssignal AATAAA, dessen Lage relativ zum 3' Ende der mRNA macht eine funktionelle Bedeutung dieses Signals in *S. lemnae* jedoch unwahrscheinlich.

Die mRNAs der ß-Tubulingene sind nur 1,4 kb lang und lassen sich durch Oligo-(dT) Cellulose Chromatographie nur sehr schwach anreichern. Da offenbar auch ein funktionelles Polyadenylierungssignal fehlt, wird vermutet, daß die ß-Tubulin mRNAs von *S. lemnae* nicht polyadenyliert sind.

Die in ihrer Sequenz sehr verschiedenen nichtcodierenden Regionen der Gene, die unterschiedlichen 'TATA-Boxen' und das Verhältnis der Kopienzahlen von 1:5, das mit dem der beiden α-Tubu-lingene identisch ist, deutet darauf hin, daß die Tubulingene von *S. lemnae* differentiell exprimiert werden können.

6. SUMMARY

The hypotrichous ciliate *Stylonychia lemnae* possesses two different types of macronuclear molecules coding for β-tubulin (β1: 1.85 kb; β2: 1.83 kb) present in 150.000 (β1) and 30.000 copies (β2) per macronucleus.

Both β-tubulin genes are transcriptionally active. The mRNAs of the genes are identical in lenghth (1.4 kb) and encode an identical protein which is highly homologous to the β-tubulins of higher eukaryotes. The coding regions of the genes (1329 bp) are not interrupted by introns.

In the coding region of β1 a TAA triplett encodes glutamine. The codon TAG, specifying glutamine in holotrichous ciliates is not present in the β-tubulin genes of *S. lemnae*. Codon usage is biased, out of the 64 possible codons only 43 and 40 are used in the β1 and β2 tubulin genes respectively.

The non coding regions of the genes differ in length and nucleotide sequence and are terminated by inverted C_4A_4 telomeric repeats. Not all regulatory signals of gene expression known from other eukaryotes are present.

In the 5' non coding regions (β1: 126 bp; β2: 170 bp) a common promoter structure consisting of a TATA-box-like sequence flanked by G+C-rich stretches was identified upstream of the transcriptional start point. A conserved sequence probably involved in translation initiation is found close to the translational start codon ATG. Conserved hairpin structures located near by the 5' terminal repeats are supposed to represent the replication origins of the macronuclear molecules.

In the 3' non coding regions of the genes (β1: 343 bp; β2: 284 bp) a consensus sequence probably involved in 3' RNA processing is located at the region corresponding to the 3' end of the mRNA.

The eukaryotic polyadenylation signal AATAAA seems not to be functional in *S. lemnae*. Its locations in β1 and its absence in β2, the length of the β-

tubulin mRNAs and affinity chromatography indicate, that the β-tubulin messengers of *S. lemnae* are not polyadenylated.

The particular non coding regions of the genes and the relation of copy numbers similar to that of the α-tubulin genes indicate, that the macronuclear β-tubulin genes of *S. lemnae* may be expressed differently.

7. LITERATUR

Adachi Y, Toda T, Niwa O and Yanagida M (1986):
Differential expression of essential and nonessential α-tubulin genes in *Schizosaccharomyces pombe*. Mol Cell Biol **6**, 2168-2178

Ammermann D (1965):
Cytologische und genetische Untersuchungen an dem Ciliaten *Stylonychia mytilus* Ehrenberg. Arch Protistenk **108**, 109-152

Ammermann D (1971):
Morphology and development of the macronuclei of the ciliates *Stylonychia mytilus* and *Euplotes aediculatus*. Chromosoma (Berl.) **33**, 209-238

Ammermann D and Muenz A (1982):
DNA and protein content of different hypotrich ciliates. Europ J Cell Biol **27**, 22-24

Ammermann D and Schlegel M (1983):
Characterization of two sibling species of the genus *Stylonychia* (Ciliata, Hypotricha): *S. mytilus* Ehrenberg, 1838 and *S. lemnae* n.sp.. I Morphology and reproductive behaviour. J Protozool **30**, 290-294

Ammermann D, Steinbrück G, v Berger L, and Hennig W (1974):
The development of the macronucleus in the ciliated protozoan *Stylonychia mytilus*. Chromosoma (Berl) **45**, 401-429

Aviv H and Leder P (1972):
Purification of biological active globin mRNA by chromatography on oligothymidylic acid cellulose. Proc Natl Acad Sci USA **69**, 1409-1412

Baker C C, Herisse J, Courtois G, Galibert F and Ziff E (1979):
Messenger RNA for the Ad2 DNA binding protein: DNA sequences encoding the first leader and heterogeneity at the mRNA 5' end. Cell **18**, 569-580

Bannon G A, Calzone F J, Bowen J K, Allis C D and Gorovsky M A (1983):
Multiple, independently regulated, polyadenylated messages for histone H3 and H4 in *Tetrahymena*. Nucl Acids Res **11**, 3903-3917

Becker K F (1987):
Klonierung und Charakterisierung eines kleinen Makronukleusgens von *Stylonychia lemnae*. Diplomarbeit Univ. Tübingen

Bennetzen J L and Hall B D (1982):
Codon selection in Yeast. J Biol Chem **257**, 3026-3031

Berget S M (1984):
Are U_4 small nuclear ribonucleoproteins involved in polyadenylation? Nature (London) **309**, 179-182

Bialojan S, Falkenburg D and Renkawitz-Pohl R (1984):
Characterization and developmental expression of β tubulin genes in *Drosophila melanogaster*. EMBO J **3**, 2543-2548

Birnboim H C and Doly J (1979):
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl Acids Res **7**, 1513-1523

Birnstiel M L, Busslinger M and Strub K (1985):
Transcription termination and 3' processing: the end is in site! Cell **41**, 349-359

Blackburn E H, Budarf M L, Challoner P B, Cherry J M, Howard E A, Katzen A L, Pan W C and Ryan T (1983):
DNA termini in ciliate macronuclei. Cold Spring Harbour Symp Quant Biol **47**, 1195-1207

Blackburn E H (1984):
Telomeres: Do the ends justify the means? Cell **37**, 7-8

Bond J F and Farmer S R (1983):
Regulation of tubulin and actin mRNA production in rat brain: expression of a new β-tubulin mRNA with development. Mol Cell Biol **3**, 1333-1342

Bond J F, Robinson G F and Farmer S R (1984):
Differential expression of two neural cell-specific β-tubulin mRNAs during rat brain develpoment. Mol Cell Biol **4**, 1313-1319

Boswell R E, Klobutcher L A and Prescott D M (1982):
Inverted terminal repeats are added to genes during macronuclear development in *Oxytricha nova*. Proc Natl Acad Sci USA **79**, 3255-3259

Boyer H W and Roulland-Dussoix D (1969):
A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J Mol Biol **41**, 459-472

Breitling F and Little M (1986):
Carboxy-terminal regions on the surface of tubulin and microtubules. Epitope locations of YOL1/34, DM1A and DM1B. J Mol Biol **189**, 367-370

Brunke K J, Young E E, Buchbinder E U and Weeks D P (1982):
Coordinate regulation of the four tubulin genes of *Chlamydomonas reinhardtii*. Nucl Acids Res **10**, 1295-1310

Bryan J and Wilson L (1971):
Are cytoplasmic microtubules heteropolymers? PNAS **68**, 1762-1766

Bucher P and Trifonov E (1986):
Compilation and analysis of eukaryotic Pol II promoter sequences. Nucl Acids Res **14**, 10009-10026

Buell N, Wickens F, Payuvar and Schimke R (1977):
Synthesis of full length c-DNAs from four partially purified oviduct mRNAs. J Biol Chem **253**, 2471-2482

Burland T G et al. (1983):
J Cell Biol **97**, 1852-1859

Burland T G et al. (1984):
Genetic analysis of resistance to benzimidazoles in *Physarum*: Differential expression of β-tubulin genes. Genetics **108**, 123

Caron F and Meyer E (1985):
Does *Paramecium primaurelia* use a different genetic code in its macronucleus? Nature (London) **314**, 185-188

Cavener D R (1987):
Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in *Drosophila* and vertebrates. Nucl Acids Res **15**, 1353-1361

Cech T R (1986):
The generality of self-splicing RNA: Relationship to nuclear mRNA splicing. Cell **44**, 207-210

Cech T R and Bass B L (1986):
Biological catalysis by RNA. Ann Rev Biochem **55**, 599-629

Cleveland D W, Lopata M A, Mac Donald R J, Cowan N J, Rutter W J and Kirschner M W (1980):
A study of the number and evolutionary conservation of genes coding for α- and β-tubulin and β- and γ-cytoplasmic actin using cloned c-DNA probes. Cell **20**, 95-195

Cleveland D W and Sullivan K F (1985):
Molecular Biology and genetics of tubulin. Ann Rev Biochem **54**, 331-356

Conway L and Wickens M (1985):
A sequence downstream of A-A-U-A-A-A is required for formation of simian virus 40 late mRNA 3' termini in frog oocytes. Proc Natl Acad Sci USA **82**, 3949-3953

Conzelmann K K and Helftenbein E (1987):
Nucleotide sequence and expression of two β-tubulin genes in *Stylonychia lemnae*. J Mol Biol, in press.

Cowan N J, Dobner P R, Fuchs E V and Cleveland D W (1983):
Expression of human α-tubulin genes: Interspecies conservation of 3' untranslated regions. Mol Cell Biol **3**, 1738-1745

Cowan N J (1984):
Tubulin genes and the diversity of microtubule function. In: MacLean N (ed) Oxford Surveys on Eucaryotic Genes **1**, 36-60 Oxford Univ. Press

Dagert M and Ehrlich S D (1979):
Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. Gene **6**, 23-28

Dobner P R, Kislauskis E, Wentworth B M and Villa-Komaroff L (1987):
Alternative 5' exons either provide or deny an initiator methionine codon to the same α-tubulin coding region. Nucl Acids Res **15**, 199-218

Donis-Keller H A, Maxam A and Gilbert W (1977):
Mapping adenines, guanines and pyrimidines in RNA. Nucl Acids Res **4**, 2527-2538

Elsevier S M, Lipps H J, Steinbrück G (1978):
Histone genes in macronuclear DNA of the ciliate *Stylonychia mytilus*. Chromosoma (Berl.) **69**, 291-306

Gil A and Proudfoot N J (1984):
A sequence downstream of AATAAA is required for rabbit β-globin mRNA 3'-end formation. Nature (London) **312**, 473-475

Ginzburg L, Behar L, Givol D and Littauer U Z (1981):
The nucleotide sequence of rat α-tubulin: 3' end characteristics and evolutionary conservation. Nucl Acids Res **9**, 2691-2697

Glisin V, Crkvanjakov R and Byus C (1974):
Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. Biochemistry **13**, 2633-2637

Grass D S, Jove R and Manley J L (1987):
RNA polymerase II terminates transcription *in vitro* in the SV 40 origin region. Nucl Acids Res **15**, 4417-4436

Grell K G (1973):
Protozoology. Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Grunstein M and Wallis J (1979):
Colony hybridization. Methods Enzymol **68**, 379-389

Gubler U and Hoffmann B J (1983):
A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Gene **25**, 263-269

Guttman S D and Gorovsky M A (1979):
Cilia regeneration in starved *Tetrahymena*: an inducible system for studying gene expression and organelle biogenesis. Cell **17**, 307-317

Hall J L, Dudley L, Dobner P R, Lewis S A and Cowan N J (1983):
Identification of two human β-tubulin isotypes. Mol Cell Biol **3**, 854-862

Hall J L and Cowan N J (1985):
Structural features and restricted expression of a human α-tubulin gene. Nucl Acids Res. **13**, 207-223

Hamilton R, Watanabe C K and de Boer H A (1987):
Compilation and comparison of the sequence context around the AUG startcodons in *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs. Nucl Acids Res **15**, 3581-3593

Hanyu N, Kuchino Y, Nishimura S and Beier H (1986):
Dramatic events in ciliate evolution: alteration of UAA and UAG termination codons due to anticodon mutations in two *Tetrahymena* $tRNAs^{Gln}$. EMBO J, **5**, 1307-1311

Heckmann K (1963):
Paarungssystem und abhängige Paarungstypdifferenzierung bei dem hypotrichen Ciliaten *Euplotes vannus* O.F.Müller. Arch Protistenkd **106**, 393-421

Heckmann K (1964):
Experimentelle Untersuchungen an *Euplotes crassus*. Paarungssystem, Konjugation und Determination der Paarungstypen. Z Vererbungsl **95**, 114-124

Helftenbein E (1985):
Nucleotide sequence of a macronuclear DNA molecule coding for α-tubulin from the Ciliate *Stylonychia lemnae*. Special codon usage: TAA is not a translation termination codon. Nucl. Acids Res. **13** (2), 415-433

Helftenbein E and Conzelmann K K (1987):
Unusual features of the noncoding regions of expressed macronuclear genes from *Stylonychia lemnae*. Submitted to Nucl Acids Res

Helftenbein E, Meinecke, Müller, Wegner, Müller S and Grummt (198X):
An overamplified macronuclear DNA molecule of the hypotrichous ciliate *Stylonychia* replicates autonomously in mouse L-cells. sumbitted to Proc Natl Acad Sci USA

Helftenbein E and Müller E (1987):
Both α-tubulin genes are transcriptionally active in *Stylonychia lemnae*. Curr Genetics (in press)

Horowitz S and Gorovsky M A (1985):
An unusual genetic code in nuclear genes of *Tetrahymena*. Proc Natl Acad Sci USA **82**, 2452-2455

Horowitz S, Bowen J K, Bannon G A and Gorovsky M A (1987):
Unusual features of transcribed and translated regions of the histone H4 gene family of *Tetrahymena thermophila*. Nucl Acids Res **15** (1), 141-160

Ikemura T (1981):
Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translation system. J Mol Biol **151**, 389-409

Ikemura T (1985):
Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. Mol Biol Evol **2**, 13-34

Kaine B P and Spear B B (1982):
Nucleotide sequence of a macronuclear gene for actin in *Oxytricha fallax*. Nature (London) **295**, 430-432

Kavenoff R and Zimm B H (1973):
Chromosome-sized DNA molecules from *Drosophila*. Chromosoma (Berl.) **41**, 1-27

Kimmel B E, Samson S, Wu J, Hirschberg R and Yarbrough L R (1985)
Tubulin genes of the african trypanosome *Trypanosoma brucei rhodesiense*: nucleotide sequence of a 3.7 kb fragment containing genes for α- and β-tubulins. Gene **35**, 237-248

Kirschner M W (1978):
Microtubule assembly and nucleation. In: Bourne G H, Danielli G F (eds) Int Rev Cytol **54**, Acad. Press, N.Y. pp 1-71

Klobutcher L A, Swanton M T, Donini P and Prescott D M (1981):
All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. Proc Natl Acad Sci USA **78**, 3015-3019

Klobutcher L A, Jahn C L and Prescott D M (1984):
Internal sequences are eliminated from genes during macronuclear development in the ciliated protozoan *Oxytricha nova*. Cell **36**, 1045-1055

Klobutcher L A, Vailonis-Walsh A M, Cahill K and Ribas-Aparicio R M (1986): Gene-sized macronuclear DNA molecules are clustered in micronuclear chromosomes of the ciliate *Oxytricha nova*. Mol Cell Biol **6**, 3606-3613

Kozak M (1981):
Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. Nucl Acids Res **9**, 5233-5252

Kozak M (1984):
Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. Nucl Acids Res **12** (2), 857-872

Kozak M (1986):
Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. Cell **44**, 283-292

Kraut H, Lipps H J and Prescott D M (1986):
The genome of hypotrichous ciliates. Int. Rev. Cytol. **99**, 1-27

Krug M S and Berger S L (1986):
A micromethod for measuring the molar concentration of polyadenylated RNA in the presence of ribosomal RNA. Anal Biochem **153**, 315-323

Kuchino Y, Hanyu N, Tashiro F and Nishimura S (1985):
Tetrahymena thermophila glutamine tRNA and its gene that corresponds to UAA termination codon. Proc Natl Acad Sci USA **82**, 4758-4762

Lauth M R, Spear B B, Heumann J and Prescott D M (1976):
DNA of ciliated Protozoa: DNA sequence diminution during macronuclear development of *Oxytricha*. Cell **7**, 67-74

Lefebvre P A, Silflow C D, Wieben E D and Rosenblum J L (1980):
Increased levels of mRNAs for tubulin and other flagellar proteins after amputation or shortening of *Chlamydomonas* flagella. Cell **20**, 469-477

Lemischka I R and Sharp P A (1982):
The sequences of an expressed rat α-tubulin gene and a pseudogene with an inserted repetitive element. Nature **300**, 330-335

Lewis S A, Gilmartin M E, Hall J L and Cowan N J (1985):
Three expressed sequences within the human β-tubulin multigene family each define a distinct isotope. J Mol Biol **182**, 11-20

Lewis S A, Gwo-Shu Lee M and Cowan N J (1985):
Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. J Cell Biol **101**, 852-861

Lipps H J and Steinbrück G (1978):
Free genes for rRNAs in the macronuclear genome of the ciliate *Stylonychia mytilus*. Chromosoma (Berl.) **69**, 21-26

Lopata M A, Havercroft J C, Chow L T and Cleveland D W (1983):
Four unique genes required for β-tubulin expression in vertebrates. Cell **32**, 713-724

Mandelkow E M, Herrmann M and Rühl U (1985):
Tubulin domains probed by limited proteolysis and subunit-specific antibodies. J. Mol Biol **185**, 311-327

Maniatis T, Jeffrey A and v.d. Sande H (1975):
Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. Biochemistry **14**, 3787-3794

Maniatis T, Fritsch E F and Sambrook J (1982):
Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Manley L J, Yu H and Ryner L (1985):
RNA sequence containing hexanucleotide AATAAA directs efficient mRNA polyadenylation in vitro. Mol Cell Biol **5**, 373-379

Maxam A and Gilbert W (1977):
A new method for sequencing DNA. Proc Natl Acad Sci USA **74**, 560-564

Maxam A and Gilbert W (1980):
Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavages. Methods Enzymol **65**, 499-560

McDonnel M W, Simon M N and Studier F W (1977):
Analysis of restriction fragments ot T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. J Mol Biol **110**, 119-146

McLauchlan J, Gaffney D, Whitton J L and Clements J D (1985):
The consensus sequence YGTGTTYY located downstream from the AATAAA signal is required for efficient formation of mRNA 3' termini. Nucl Acids Res **13**, 1347-1368

Mc Master G K and Carmichael G G (1977):
Analysis of single and double-stranded nucleic acids on polyacrylamid and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. Proc Natl Acad Sci USA **74**, 4835-4838

Meyers G and Helftenbein E (1987 o. 1988):
Transfection of the hypotrichous ciliate *Stylonychia lemnae* with linear DNA vectors. Submitted to Gene

Monteiro M J and Cox R A (1987):
Primary structure of an α-tubulin gene of *Physarum polycephalum*. J Mol Biol **193**, 427-438

Neff N F, Thomas J H, Grisafi P and Botstein D (1983):
Isolation of the β-tubulin gene from yeast and demonstration of its essential function in vivo. Cell **33**, 211-219

Nock A (1981):
RNA and macronuclear transcription in the ciliate *Stylonychia mytilus*. Chromosoma (Berl) **83**, 209-220

Nomoto M, Imai N, Saiga H, Matsui T and Mita T (1987):
Characterization of two types of histone H2B genes from macronuclei of *Tetrahymena thermophila*. Nucl Acids Res **15**, 5681-5697

Oka Y, Shiota S, Nakai S, Nishida Y and Okubo S (1980):
Inverted terminal repeat sequence in the macronuclear DNA of *Stylonychia pustulata*. Gene **10**, 301-306

Orbach M J, Porro E B and Yanofsky C (1986):
Cloning and characterization of the gene for β-tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. Mol Cell Biol **6**, 2452-2461

Palacios R, Palmiter R and Schimke R (1972):
Identification of ovalbumin-synthesizing polysomes. J Biol Chem **247**, 2316-2321

Platt T (1986):
Transcription termination and the regulation of gene expression. Ann Rev Biochem **55**, 339-372

Pluta A F, Kaine B P and Spear B B (1982):
The terminal organization of macronuclear DNA in *Oxytricha fallax*. Nucl Acids Res **10**, 8145-8154

Preer J R Jr, Preer L B, Rudman B M and Barnett A J (1985):
A deviation from the universal code: The gene for surface protein 51A in *Paramecium*. Nature (London) **314**, 188-190

Prescott D M, Bostock C J, Murti K G, Lauth M R and Gamow E (1971):
DNA of ciliated protozoa I. Electron microscopic and sedimentation analyses of macronuclear and micronuclear DNA of *Stylonychia mytilus*. Chromosoma (Berl.) **34**, 355-366

Prescott D M, Murti K G and Bostock C J (1973):
Genetic apparatus of *Stylonychia* sp. Nature (Lond.) **242**, 597-600

Proudfoot N J and Brownlee G G (1976):
3' noncoding sequences in eucaryotic messenger RNA. Nature (London) **263**, 211-213

Pustell J and Kafatos F C (1982):
A conveniable and adaptable package of DNA sequence analysis programs for microcomputers. Nucl Acids Res **10**, 51-59

Radloff R, Bauer W and Vinograd J (1967):
A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: The closed circular DNA in HeLa cells. Proc Natl Acad Sci USA **57**,1514-1521

Raff E C (1984):
Genetics of microtubule systems. J Cell Biol **99**, 1-10

Raikov I B (1982):
The protozoan nucleus. Springer. Berlin, Heidelberg, New York

Rudolph J E, Kimble M, Hoyle H D, Subler M A and Raff E C (1987):
Three *Drosophila* beta-tubulin sequences: a developmentally regulated isoform (ß3), the testis-specific isoform (ß2), and an assembly-defective mutation of the testis-specific isoform ($B2t^{88}$) reveal both an ancient divergence in metazoan isotypes and structural constraints for ß-tubulin function. Mol Cell Biol **7**, 2231-2242

Ryner L C and Manley J L (1987):
Requirements for accurate and efficient mRNA 3' end cleavage and polyadenylation of a Simian virus 40 early pre-RNA *in vitro*. Mol Cell Biol **7**, 495-503

Sanger F, Nicklen S and Coulson A R (1977):
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA **74**, 5463-5467

Schatz P J, Solomon F and Botstein D (1986):
Genetically essential and nonessential α-tubulin genes specify functionally interchangeable proteins. Mol Cell Biol **6**, 3722-3733

Schedl T, Owens J, Dove W F and Burland T G (1984):
Genetics of the tubulin gene families of *Physarum*. Genetics **108**, 143-164

Serrano L, de la Torre J, Maccioni R B and Avila J (1984):
Involvement of the carboxyterminal domain of tubulin in the regulation of its assembly. Proc Natl Acad Sci USA **81**, 5989-5993

Shinnik T M, Lund E, Smithies O and Blattner F R (1975):
Hybridization of labeled RNA to DNA in agarose gels. Nucl Acids Res **2**, 1911-1929

Silflow C D and Rosenbaum J L (1981):
Multiple α- and β-tubulin genes in *Chlamydomonas* and regulation of tubulin mRNA levels after deflagellation. Cell **24**, 81-88

Simon R (1985):
Untersuchungen zur Genexpression bei der Regeneration des Ciliaten *Stylonychia lemnae* nach Behandlung mit Harnstoff. Diss. Univ. Tübingen

Southern E (1975):
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol **98**, 503-517

Spear B B (1980):
Isolation and mapping of the rRNA genes in the macronucleus of *Oxytricha fallax*. Chromosoma (Berl.) **77**, 93-102

Steinbrück G, Haas I, Hellmer K-H and Ammermann D (1981):
Characterization of macronuclear DNA in five species of ciliates. Chromosoma (Berlin) **83**, 199-208

Steinbrück G and Schlegel M (1983):
Characterization of two sibling species of the genus *Stylonychia* (Ciliata, Hypotricha): *S. mytilus* Ehrenberg, 1838 and *S. lemnae* n.sp.. II. Biochemical characterization. J Protozool **30**, 294-300

Sullivan K F, Havercroft J C, Machlin P S and Cleveland D W (1986):
Sequence and expression of the chicken β5- and β4-tubulin genes define a pair of divergent β-tubulins with complementary patterns of expression. Mol Cell Biol **6**, 4409-4418

Thomas P S (1980):
Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc Natl Acad Sci USA **77**, 5201-5205

Valenzuela P, Quiroga M, Zaldivar J, Rutter W J, Kirschner M W and Cleveland D W (1981):
Nucleotide and corresponding amino acid sequences encoded by α and β tubulin mRNAs. Nature (London) **289**, 650-655

Vieira J and Messing J (1982):
The pUC plasmids, an M13 mp7 - derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene **19**, 259-268

Villasante A, Wang D, Dobner P, Dolph P, Lewis S A and Cowan N J (1986):
Six mouse α-tubulin mRNAs encode five distinct isotypes: testis-specific expression of two sister genes. Mol Cell Biol **6**, 2409-2419

Wang D, Villasante A, Lewis S A and Cowan N J (1986):
The mammalian β-tubulin repertoire: haematopoietic expression of a novel, heterologous β-tubulin isotype. J Cell Biol **103**, 1903-1910

Wickens M and Stephenson P (1984):
Role of the conserved AAUAAA sequence: four AAUAAA point mutations prevent mRNA 3' end formation. Science **226**, 1045-1051

Wieser M (1984):
Untersuchungen zur Genexpression bei dem Ciliaten *Stylonychia lemnae* nach Behandlung mit dem Pflanzenlectin Concanavalin A. Dissertation Univ. Tübingen

Wu C (1984):
Activating protein factor binds *in vitro* to upstream control sequences in heat shock gene chromatin. Nature (London) **311**, 81-84

Wünning I U and Lipps H J (1983):
A transformation system for the hypotrichous ciliate *Stylonychia mytilus*. EMBO J **2**, 1753-1757

Yanisch-Perron C, Vieira J and Messing J (1985):
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC 19 vectors. Gene **33**, 103-119

Youngblom J, Schloss J A and Silflow C D (1984):
The two β-tubulin genes of *Chlamydomonas reinhardtii* code for identical proteins. Mol Cell Biol **4**, 2686-2696

Lebenslauf

23. 1. 1955	geboren in Albstadt-Tailfingen (Baden-Württemberg)
1961–1965	Grundschule in Tailfingen
1965–1967	Realschule in Tailfingen
1967–1974	Math.-nat. Gymnasium Albstadt-Ebingen
29. 5. 1974	Abitur
1. 7. 1974–30. 6. 76	Bundeswehr
17. 9. 1976	Beginn des Studiums der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
3. 7. 1978	Vordiplomprüfung in den Fächern Zoologie, Botanik, Chemie und Physik
WS 1981/1982	Diplomprüfungen in den Fächern Zoologie (Hauptfach, Prof. Ammermann), Genetik (Prof. Seyffert), Mikrobiologie (Prof. Braun) und Biochemie (Prof. Mecke)
21.6.1982–21.12.83	Anfertigung der Diplomarbeit (»Die Entwicklung von *Trypanosoma cruzi* in *Dipetalogaster maxima* und *Triatoma pallidipennis*«) bei Prof. Wenk am Tropenmedizinischen Institut der Universität
seit 18. 2. 1984	verheiratet
seit 1. 9. 1984	Doktorand bei Prof. Ammermann (Institut für Biologie III, Abt. Zellbiologie). Thema der Arbeit: »Molekulare Analyse der β-Tubulingene aus dem Makronukleus des hypotrichen Ciliaten *Stylonychia lemnae*«.

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, U. An der Heiden, R. Apfelbach, C. F. Bardele, F. Bentrup, V. Braun, W. Engels, K. G. Grell, J. Guglielmi, A. Hager, V. Hemleben, C. Jönsson, G. Jung, E. Kulzer, D. Mecke, F. P. Möhres, H. Netzel, F. Oberwinkler, W. Pfeiffer, K. Poralla, A. Rieker, B. Schwemmle, H. U. Seitz, W. Seyffert, D. Sperlich, J. Strähle, G. Winkelmann, K. Wöhrmann, P. Wenk, H. Zähner.